Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. K. Kochsiek

Einfluß hoher Leucin- und Ketoleucindosen auf den Glykogen- und Proteinstoffwechsel der Leber und Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Rainer Kittel

aus Schweinfurt

Würzburg, den 12. November 1980

1981

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. K. Kochsiek

Einfluß hoher Leucin- und Ketoleucindosen auf den Glykogen- und Proteinstoffwechsel der Leber und Skelettmuskulatur akut urämischer Ratten

Inaugural - Dissertation

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Rainer Kittel

aus Schweinfurt

Würzburg, den 12. November 1980

Referent:	Prof. Dr. A. Heidland
Korreferent:	Prof. Dr. K. Kochsiek
Dekan:	Prof. Dr. K.H. Wulf

Tag der mündlichen Prüfung: 27.2.1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Prinzipien der therapeutischen Diät bei akuter Niereninsuffizienz	1
1.2	Grundlagen des Glykogenstoffwechsels	2
1.3	Veränderungen des Glykogenstoffwechsels bei Urämie	3
1.4	Gestörte Insulinwirkung bei urämischer Intoxikation	3
1.5	Hyperglykämie und Glukoneogenese	4
1.6	Der Alaninzyklus	5
1.7	Die Rolle von Leucin im Stoffwechsel	6
1.8	Pathologische Leucinwirkung auf den Blutzuckerspiegel	8
1.9	Der urämische Proteinstoffwechsel und Therapieversuche mit Ketoanalogen der essentiellen Aminosäuren	9
1.10	Fragestellung der Arbeit	10
2.	Experimentell-methodischer Teil	11
2.1	Tierexperimentelle Methodik	11
2.2	Analytik	13
2.2.1	Bestimmung der Blutwerte	13
2.2.2	Kohlenhydrat- und Proteingehalt, Enzymaktivitäten der Organe	13
3.	Ergebnisse	17
3.1	Gewichtsänderungen, Serumharnstoff- und Blutzuckerspiegel	17

Seite

3.2 Proteingehalt von Leber und Muskel 20

3.3 Glykogengehalt von Leber und Muskel 22

3.4 Gesamtkohlenhydratgehalt von Leber und Muskel 25

3.5 Glykogenphosphorylaseaktivität von Leber und Muskel 28

3.6 Glykogensynthetaseaktivität von Leber und Muskel 36

3.7 Überlebenszeiten der Tiere unter verschiedenen Substitutionsbedingungen 44

4. Diskussion 45

5. Zusammenfassung 55

6. Literaturverzeichnis

1. EINLEITUNG

1.1 Prinzipien der therapeutischen Diät bei akuter Niereninsuffizienz

Seit langem wird versucht, die katabolen Prozesse, die den Verlauf des akuten Nierenversagens komplizieren können, aufzuklären. Das ist jedoch bis heute nicht gelungen. Zahlreiche Urämiegifte wurden entdeckt und der Reihe nach für die Pathogenese der urämischen Intoxikation verantwortlich gemacht (1,2). Dennoch blieben, nachdem zahlreiche dieser Gifte durch eine wirksame Dialysebehandlung entfernt werden konnten, schwere metabolische Entgleisungen bestehen.

Heute ist man eher geneigt, die Ursache der urämischen Intoxikation in einer generellen Stoffwechselstörung zu suchen, die in nahezu jedes körpereigene System eingreift (6,8). Der Elektrolyt-, Säure- und Wasserhaushalt kann mit genau bilanzierten Infusionen und der Dialyse meist erhalten werden. Moderne Diäten versuchen den am schwersten gestörten Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel günstig zu beeinflussen.

Grundlage dieser Diätformen ist eine proteinarme, aber kalorienreiche Kost. Der Anstieg des Harnstoffs im Blut aus den abgebauten Aminosäuren soll nicht noch zusätzlich durch exogen zugeführtes Eiweiß beschleunigt werden. Umgekehrt soll der Abbau von körpereigenen Aminosäuren verringert werden. Auch die Bildung von Urämietoxinen soll vermindert werden, die vorwiegend im Rahmen einer gesteigerten Proteolyse mit rapidem Körperproteinverlust entstehen. Dieser Prozeß kann durch eine gezielte Gabe von essentiellen Aminosäuren abgeschwächt werden. Sie ersetzten gerade einen Teil der durch Proteolyse und Dialyse verlorengegangenen Aminosäuren, die selbst zu synthetisieren der menschliche Organismus nicht mehr in der Lage ist. Die Belastung der Stickstoff-Bilanz bleibt bei großer therapeutischer Wirkung auf diese Weise minimal. Gute Therapieerfolge und eine Senkung der Letalität bei bestimmten Formen des akuten Nierenversagens bestätigen diesen Ansatz. Die hohe Kalorienzufuhr von 40 - 50 kcal/kg Körpergewicht wird damit begründet, daß sich der Stoffwechsel solcher Patienten in einem Zustand des völligen Katabolismus, ausgelöst durch die akute urämische Intoxikation, befände (3, 4, 6, 9).

1.2 Grundlagen des Glykogenstoffwechsels

Der Blutglukosespiegel wird hauptsächlich durch das Hormon Insulin und seine Antagonisten Glukagon, Katecholamine, Parathormon und Cortikosteroide gesteuert. Insulin fördert den Glukosetransport in die Zellen, aktiviert die Glykogensynthese und Glykolyse, hemmt jedoch die Glukoneogenese. Daneben hat Insulin noch anabole Wirkungen auf die Proteinsynthese. Glukagon, Parathormon und die Katecholamine aktivieren über den gut erforschten cAMP-Überträgermechanismus die Glykogenolyse und Glukoneogenese. Cortikosteroide haben auf die Glukoseneubildung einen fördernden Einfluß (11, 12, 22, 25). Nach der Bindung der genannten Hormone an die Zellmembran kommt es zu einer cAMP-Konzentrationserhöhung in der Zelle. Dadurch wird eine cAMP-abhängige Proteinkinase aktiviert. Dieses Enzym besitzt zwei Angriffspunkte:

a) sie phosphoryliert die aktive Form der Glykogensynthetase und katalysiert dadurch die Umwandlung aus der dephosphorylierten, Glukose-6-Phosphat unabhängigen I-Form in die inaktive phosphorylierte, Glukose-6-Phosphat abhängige D-Form. Auf diese Weise wird die Glykogensynthese gehemmt (8, 24, 25, 26).

b) Die cyklo-AMP-abhängige Proteinkinase phosphoryliert auch die inaktive Form der Phosphorylase-Kinase und führt sie dadurch in die aktive Form über. Dieses Schlüsselenzym des Glykogenabbaus phosphoryliert nun die inaktive Phosphorylase b zur aktiven Phosphorylase a. Dieses Enzym katalysiert die Abspaltung von Glukose-1-Phosphat aus dem Glykogen (24 - 28).

Glykogensynthese und Glykogenabbau stehen damit unter der Kontrolle der cyklo-AMP-abhängigen Proteinkinase. Eine Erniedrigung der cAMP-Konzentration führt dann gemäß des steady-state-Gleichgewichts biologischer Systeme zu einer gegensätzlichen Reaktion, nämlich zur Wiederaktivierung der Glykogensynthetase und zur Hemmung des Glykogenabbaus.

Glykogensynthese und Glykogenabbau werden darüber hinaus zusätzlich durch das Enzym Phosphorylase-Phosphatase reguliert. Dieses Enzym katalysiert einmal die Inaktivierung der Phosphorylase a durch Dephosphorylierung, parallel soll sie die Aktivierung der Glykogensynthetase ebenfalls durch Dephosphorylierung bewirken. Die freiwerdende Glukose beim Abbau von Glykogen, aber auch aus der Glukoneogenese, hemmt über die Aktivierung der Phosphorylase-Phosphatase wiederum die Glykogenolyse. Glykogen hat eine entgegengesetzte Wirkung: Es hemmt die Phosphorylase-Phosphatase und begünstigt so die Glykogenolyse (8, 24-30).

1.3 Veränderungen des Glykogenstoffwechsels bei Urämie

Über den Glykogengehalt verschiedener Organe bei Urämie, speziell in der Leber und im Muskel gibt es bislang wenige Untersuchungen. Aufgrund der katabolen Stoffwechsellage in der Urämie mit Erhöhung von Glukagon, Parathormon, Katecholaminen und einem erhöhten Cortikosterioidspiegel, sollte man eine Verminderung des Glykogengehaltes erwarten. Doch werden in der Literatur verminderte, normale und erhöhte Glykogengehalte in der Leber und im Muskel beschrieben (5, 7, 24, 31, 32, 38). Die Glykogenkonzentration der Leber ist im wesentlichen von der zugeführten Nahrungsmenge und deren Zusammensetzung abhängig. Hungern führt zu einem raschen Glykogenabbau, bei ausreichender Nahrungszufuhr bleibt der Glykogengehalt auch unter urämischen Bedingungen konstant. Dies gilt jedoch vor allem für Untersuchungen an chronisch urämischen Ratten.

1.4 Gestörte Insulinwirkung bei urämischer Intoxikation

Der Glukosestoffwechsel vermag unter urämischen Bedingungen sowohl in eine Hypoglykämie als auch in eine Hyperglykämie zu entgleisen. Spontane Hypoglykämien nach Nahrungskarenz werden nicht selten im Finalstadium der chronischen Urämie gesehen und auf eine azidotische Hemmung der Glukoneogenese der Leber, bei völligem Versagen in der Niere und auf die Entleerung der Glykogenvorräte zurückgeführt.

Gleichzeitig wurde eine urämische Hyperglykämie bei verminderter Glukosetoleranz, gleichzeitig erhöhtem Insulinspiegel und veränderter Insulinwirksamkeit schon früh beschrieben und ist immer wieder bestätigt worden. Folgende Ursachen werden diskutiert: Die urämischen Leberzellen zeigen eine verminderte Reaktion auf Insulin, verstoffwechseln das Hormon jedoch uneingeschränkt. Das Pankreas antwortet auf eine Glukosebelastung mit einer vermehrten Ausschüttung an Insulin. Dagegen zeigt sich das Muskelgewebe in der Urämie als weitgehend Insulin resistent. Es besteht eine verlängerte Insulin-Halbwertszeit bei normaler hepatischer Abbaurate. Unter physiologischen Bedingungen entfallen ca. 50 % des Insulinabbaus auf extrahepatische Gewebe. Nach Reaven und Reaven (1977) ist vor allem der muskuläre Insulinabbau bei Urämie signifikant vermindert. Die Tatsache, daß nach einer Dialysebehandlung das Muskelgewebe wieder sehr viel besser auf Insulin zu reagieren vermag, läßt vermuten, daß die Insulinresistenz der Peripherie wenigstens zum Teil durch dialysierbare Hemmstoffe vermittelt wird. Eine Minderung der Insulinwirksamkeit ergibt sich auch aus der Erhöhung der Plasmakonzentration an Glukagon, das durch gegenläufige Regulation dem Insulin entgegenwirkt. Die Glukagonerhöhung wird, ähnlich wie beim Insulin, auf einen verminderten Abbau in der Niere bei normaler Pankreassekretion zurückgeführt. Die Wirkung des Glukagons wird durch die stressähnlichen, metabolischen Bedingungen, unter denen Patienten mit akutem Nierenversagen stehen, verstärkt. Eine erhöhte Ausschüttung an Katecholaminen, STH und Cortikosterioiden ist dabei die Regel (3, 5, 10, 18a, 18b, 31 - 39, 56).

1.5 Hyperglykämie und Glukoneogenese

Die urämische Hyperglykämie resultiert wahrscheinlich aus mehreren Quellen:

a) verminderte periphere Glukoseaufnahme und -oxidation
b) erhöhte Glykogenolyse
c) vermehrte hepatische Glukoneogenese

Die Hemmung der Glukoseaufnahme in peripheren Gewebe und eine Ver-

ringerung der Glykolyse ergibt sich schon aus dem oben erwähnten, gestörten Hormonverhältnis. Zusätzlich werden in der Urämie zahlreiche Enzymgifte nachweisbar, die vor allem die Glykolyse betreffen (1, 2, 5, 36 - 38, 40).

Hauptquelle des Blutzuckerspiegels ist wahrscheinlich die gesteigerte hepatische Glukoneogenese. Als Ausgangsprodukt der Glukoseneusynthese kommen Glycerol aus der Lipolyse, Pyruvat und Lactat aus der Glykolyse und glukogene Aminosäuren, vor allem Alanin, Serin, Glycin und Threonin in Betracht. Die wichtigste Glukosevorstufe ist Alanin, dem eine Schlüsselfunktion in der Glukoneogenese zugeschrieben wird. In der Leberzelle wird Alanin, wie auch andere glukogene Aminosäuren zu Pyruvat desaminiert, wobei der Stickstoff auf Alpha-Ketoglutarat übertragen wird. Pyruvat wird in der bekannten Umkehrung der Glykolyse zu Glukose resynthetisiert. Eine hormonelle Kontrolle der Glukoneogenese wird via Enzymrepression bzw. Enzymaktivierung durch die Hormone Insulin (Glukoneogenesehemmung) und Glukagon, PTH, Cortikosteroide sowie Katecholamine (Stimulierung) vermittelt. Schlüsselenzym ist die Pyruvatcarboxylase. Glukagon erleichtert ferner den Einstrom von glukogenen Aminosäuren in die Leberzelle und erzeugt so u.a. eine hohe Alaninkonzentration. Eine Steigerung der Alaninkonzentration führt auch ohne Glukagoneinfluß zu einem proportionalen Anstieg der durch die Glukoneogenese erzeugten Glukose (11, 12, 22 - 25, 31, 32, 37, 39, 41 - 46).

1.6 Der Alaninzyklus

Von der Leber ausgeschüttete Glukose wird im Muskel zu Pyruvat abgebaut und bevorzugt mit Stickstoffgruppen der ebenfalls im Muskel oxydierten verzweigtkettigen Aminosäuren, Leucin, Valin, Isoleucin mit Hilfe von Alpha-Ketoglutarat, das die Stickstoffgruppe intermediär übernimmt, zu Alanin umgebaut. Alanin verläßt den Muskel und gibt in der Leber den Aminostickstoff wieder an Alpha-Ketoglutarat ab, von da wird er dann weiter verstoffwechselt. Das übrigbleibende Pyruvat wird in der Glukoneogenese zu Glukose aufgebaut. Alanin dient so neben dem

Lactat aus dem Corizyklus als Übermittler des Kohlenstoffskeletts für Glukose vom Muskel zur Leber, da der Muskel die für die Glukosesynthese nötigen Enzyme nicht besitzt. Alanin entgiftet aber auch den bei der Verbrennung der verzweigtkettigen Aminosäuren freiwerdenden Ammoniak durch seine eigene Synthese.

Unter den Ruhebedingungen stammt das Pyruvat für die Alaninsynthese im Muskel aus exogen zugeführter Glukose. Erst bei Muskelarbeit, langem Hunger und pathologischen Veränderungen (z.B. Streß, Trauma, Urämie) werden auch Substrate aus der intramuskulären Glykogenolyse und Proteolyse zur Energiegewinnung herangezogen. Die Alaninkonzentration, die ja bestimmend für die Glukosenneusynthese in der Leber ist, hängt selbst vom Glukoseangebot an die Muskelzelle, dem ungestörtem Muskelstoffwechsel und dem Angebot an verzweigtkettigen Aminosäuren, vor allem von Leucin ab. In akuter und chronischer Urämie, Schock und Trauma sind Alaninproduktion und Leucinoxydation im Muskel gleichsinnig gesteigert. Auch eine erhöhte Leucinzufuhr steigert im Experiment den Umbau von Glukose zu Alanin im Muskel (23 - 25, 41 - 46, 60).

1.7 Die Rolle von Leucin im Stoffwechsel

Im folgenden wird Leucin stellvertretend für die verzweigtkettigen Aminosäuren genannt, einmal wegen seiner stärkeren Wirksamkeit, zum anderen wurde diese Aminosäure am meisten untersucht. Leucin ist eine essentielle Aminosäure, sie kann vom Körper nicht denovosynthetisiert werden und muß mit der Nahrung zugeführt werden. Das metabolische Schicksal von Leucin ist recht genau bekannt: Nach erfolgter Resorption im Darm wird Leucin von der Leber aufgenommen, aber nicht verstoffwechselt, sondern sofort wieder in den Körperkreislauf entlassen. So steigt nach einer Mahlzeit, die Leucin enthält, sofort sein Plasmaspiegel an. In der Peripherie wird es meist im Skelettmuskel aufgenommen: Zwar zeigen auch andere Gewebe eine hohe Konzentration an Leucintransaminasen, z.B. Gehirn und Niere, aber dem Muskel kommt allein wegen seiner größeren Masse schon eine höhere Bedeutung im Leucinstoffwechsel zu. Auch nach Leucinbelastung durch Infusionen wurde ein stärkerer Anstieg der Leucintransaminase im Muskel als in allen anderen Geweben festgestellt. Die Leber zeigte sich bei allen Untersuchungen unbeteiligt.

Die weitere Verwendung des Leucin hängt vom Zustand der Muskelzelle ab. Es kann in das Protein eingebaut, oder mit erheblichem Energiegewinn oxydiert werden. Zur Oxydation wird Leucin zunächst zur Alpha-Ketoisokapronsäure desaminiert, dann über die Isovaleriansäure zu Acetoazetat und Acetyl-Coenzym A umgebaut und so in den Zitratzyklus eingeschleust. Leucin ist keine glukogene Aminosäure. Der Aminostickstoff wird von Pyruvat übernommen und gelangt über den Alaninzyklus in die Leber. Leucin ist ebenso wie die anderen verzweigtkettigen Aminosäuren Valin und Isoleucin der wichtigste Stickstofflieferant der Alaninproduktion (8, 23, 44, 47 - 51).

Der erste Schritt, die Desaminierung ist reversibel und geschwindigkeitsbestimmend, der weitere Abbau kann nicht mehr rückgängig gemacht werden. Im Nahrungsgleichgewicht verbrennt die Muskelzelle Glukose und verzweigtkettige Aminosäuren und vereinigt die Endprodukte beider Vorgänge zu Alanin. Die Leucinkonzentration bleibt im Gleichgewicht zwischen Aufnahme in die Zelle, Proteinabbau, Proteolyse und Oxydation. Die intrazelluläre Leucinkonzentration steuert nun auch nach neueren Ergebnissen das Verhältnis zwischen Proteinsynthese und Proteinabbau. Durch eine Senkung mittels erhöhter Verbrennung wird die Proteolyse des Muskeleiweißes eingeleitet. Eine neue Synthese wird gleichzeitig inhibiert. Umgekehrt führt eine Konzentrationssteigerung zu einer verstärkten Proteinsynthese und zu einer Hemmung der Proteolyse. Diese Wirkung ist hormonabhängig und scheint nur vom Anstieg oder Abfall der Leucinkonzentration abzuhängen. Dadurch wird auch die Alaninproduktion, der Glukoseverbrauch und die Glukoneogenese beeinflußt.

Bei pathologischen, katabolen Zuständen des Organismus wie Schock, Verbrennung, Trauma, Niereninsuffizienz wird Leucin zu einer Hauptbrennstoffquelle für den Muskel. Die dann gesenkte Leucinkonzentration kann durch exogene Zufuhr nicht sogleich wieder stabilisiert werden und leitet den Abbau des Muskelproteins ein. In einem physiologischen, katabolen Zustand, dem Hungern, ist in den ersten Tagen die Leucinoxydation erhöht, sinkt aber dann nach etwa 8 Tagen zusammen mit dem Proteinumsatz ab (23, 47 - 52, 55, 58 - 61).

Hormone, die den Proteinstoffwechsel beeinflussen, sind Insulin, Glukagon, Katecholamine und Cortikosteroide. Insulin fördert den Aminosäuretransport, vor allem der verzweigtkettigen Aminosäuren in die Muskelzellen, stimuliert die Proteinsynthese, und hemmt die Freisetzung wieder vor allem der verzweigtkettigen Aminosäuren aus der Muskelzelle. Der Mechanismus dieser Effekte ist bislang nicht aufgeklärt, hängt aber möglicherweise mit der Leucinkonzentration und/oder einer direkten Wirkung auf die ribosomale Proteinsynthese zusammen.

Glukagon und Katecholamine erhöhen die Leucinoxydation, verringern die Proteinsynthese und steigern den Abbau. Glukagon läßt Alanin verstärkt in die Leberzellen einfließen und begünstigt die Glukoneogenese. Glukocorticoide haben im Muskel eine Glukagon ähnliche Wirkung, erhöhen aber in der Leber die Proteinsynthese (8, 12, 22, 58).

1.8 Pathologische Leucinwirkung auf den Blutzuckerspiegel

Durch Leucingabe ausgelöste Hypoglykämien werden bei drei definierten Krankheiten beobachtet:

a) Idiopathische leucininduzierte Hypoglykämie

Sie beruht wahrscheinlich auf einem leucinempfindlichen Pankreas. Nach experimenteller Leucingabe oder Nahrungsaufnahme von stark leucinhaltigem Mais entwickelt sich innerhalb von einer bis zwei Stunden, bei Infusion sofort eine schwere Hypoglykämie. Sie soll durch eine vermehrte Ausschüttung von Insulin auf den Leucinreiz zustandekommen.

b) Leucinempfindliche ß-Zellhyperplasien

Bei diesen Tumoren läßt sich häufig mit Leucin eine insulinabhängige Hypoglykämie erzeugen.

c) Ahornsirupkrankheit

Sie beruht auf einem genetisch bedingten Enzymdefekt, der den Abbau der desaminierten verzweigtkettigen Aminosäuren betrifft. Vor allem Leucin und α-Ketoisocapronsäure sammeln sich an und führen zu schweren

metabolischen Beeinträchtigungen u.a. des Hirnstoffwechsels. Im Verlauf dieser Krankheit beobachtet man interkurrent hypoglykämische Anfälle (8, 62, 63). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen bei Gesunden. So wurden übergewichtige Personen nach dreiwöchigem Fasten Leucininfusionen verabreicht und dabei eine massive Hyperglykämie bei unveränderten Hormonplasmakonzentrationen (Insulin und Glukagon) beobachtet. Normal gesunde Menschen und Ratten, die eine leucinreiche Diät verabreicht bekamen, reagierten mit einer langanhaltenden Hyperglykämie (52, 55, 64). Bis auf eine postulierte Glukoseoxydationsverminderung wurden keine Erklärungen für die beobachteten Effekte angeboten.

1.9 Der urämische Proteinstoffwechsel und Therapieversuche mit Ketoanalogen der essentiellen Aminosäuren

In akuter Urämie entwickelt sich oft der ohnehin schwere Proteinabbau, der auch bei chronischer Niereninsuffizienz vorhanden ist, zu einem foudroyanten Verlauf. Es kann zu einer Harnstoffsteigerung von mehr als 60 mg% täglich kommen, das einem Eiweißverlust von 70 g täglich entspricht. Bei Persistenz des Nierenversagens kann die Proteolyse lebensbedrohliche Formen annehmen. Die schon erwähnte Unordnung des Hormonhaushaltes mit einer gesteigerten Corticosteroid - und Katecholaminausschüttung heizt den Katabolismus weiter an.

Bei Untersuchungen an akut urämischen Ratten fand man einen Abbau des Skelettmuskels bei einer vermehrten hepatischen Neusynthese. Der offensichtliche Muskelschwund ist auch beim Menschen nach längerer Dialyse zu beobachten (3, 6, 53, 54).

Durch Dialyse und proteinarmer, aber mit essentiellen Aminosäuren angereicherter Diät gelingt es oft, den rapiden Verfall zu bremsen. Einen durch die essentiellen Aminosäuren erhöhten Harnstoff und vermehrte Urämie - Toxine nimmt man dabei in Kauf.
Eine Möglichkeit, ohne zusätzliche Stickstoffzufuhr dennoch die abgebauten Aminosäuren zu ersetzen, besteht in der Verwendung stickstoffreier Vorstufen der essentiellen Aminosäuren, nämlich ihrer

Ketoanaloga (65). Versuche mit der Applikation bei hungernden, urämischen und sich in anderen katabolen Zuständen befindenden Tiere und freiwilligen Versuchspersonen waren erfolgreich. Der Harnstoffanstieg konnte bei annähernd gleicher Wirksamkeit vermindert werden. Nebenwirkungen und eine mögliche Toxizität der Ketosäuren müssen noch eingehender untersucht werden (66 - 68).

1.10 Fragestellung der Arbeit

Leucin spielt eine wichtige Rolle im Proteinstoffwechsel und ist eng mit dem Kohlenhydratstoffwechsel über den Alaninzyklus verknüpft. In der akuten Urämie ist beides stark gestört. Der Versuch der Therapie mit essentiellen Aminosäuren hat sich als erfolgreich herausgestellt. Der Einfluß von Leucin auf den urämischen Stoffwechsel war bisher nur in einigen Teilbereichen zusammen mit den anderen verzweigtkettigen Aminosäuren untersucht worden. Mit der isolierten Gabe soll festgestellt werden, welche Effekte auf Leucin allein zurückzuführen sind. Seine anabolen Eigenschaften lassen einen günstigen Effekt auf den gestörten urämischen Stoffwechsel erwarten. Seine Beziehung zum Glykogenstoffwechsel kann über die Messung der Aktivitätsänderungen der am Glykogenauf- und -abbau beteiligten Enzyme geklärt werden. Durch die Gabe von α-Ketoisocapronsäure wird die Ersetzbarkeit von Leucin ohne Stickstoffbilanzverschlechterung und die Unschädlichkeit des Ketoanalogen geprüft.

2. Experimentell-methodischer Teil

2.1 Tierexperimentelle Methodik

Für alle Untersuchungen wurden weibliche Wistar-Ratten der Firma Ivanovas/Kislegg verwendet. Das Gewicht der Ratten lag zwischen 170 und 190 g. Bis unmittelbar vor Versuchsbeginn erhielten alle Tiere Altromin Standardfutter und Wasser ad libitum.
Vor Operation wurde jede Ratte gewogen, anschließend durch eine kurze Äthernarkose anästhesiert (Äthertropf). Um eine akute experimentelle Urämie zu erzeugen, wurden zwei Methoden angewandt:

a) bilaterale Nephrektomie
Mit einem Mittellinienschnitt wurde das Fell dorsal eröffnet und die Nieren einzeln nach Durchtrennung der darüber liegenden Muskelschicht freigelegt. Die Nierenkapsel wurde unter Schonung der Nebennieren abgestreift, die zu- und abführenden Gefäße (Arteria und Vena renalis) sowie der Ureter unterbunden und durchtrennt. Dann wurden die Nieren entfernt, der Muskeldefekt mit Histoacrylgewebekleber verschlossen und die Fellwunde verklammert (Wundklammern).

b) bilaterale Ureterligatur
Die Präparation der Nieren geschah wie bei der Binephrektomie. Nierenkapsel und Gefäße wurden belassen, nur der Ureter ca. 1 cm kaudal der Niere doppelt unterbunden und durchtrennt. Die Wunde wurde wie oben beschrieben verschlossen.

Zur Kontrolle wurden jeder geplanten Untersuchungsreihe eine Gruppe scheinoperierter Ratten beigefügt. Dabei wurden die Tiere in der oben angegebenen Weise eröffnet, die Operationswunde ohne Verletzung der Nieren verschlossen. Um ein statistisch signifikantes Ergebnis zu erzielen, wurden für eine Gruppe und die Kontrolle jeweils 5 Tiere verwendet. Nach Operation wurden die Ratten einzeln in Käfige gesetzt und ca. 30 Minuten nach dem Eingriff zum ersten Mal gefüttert (Zeitpunkt 0). Die verwendete Diät wurde mit einer Schlundsohle direkt in die Speiseröhre appliziert. Die weiteren Fütterungsabstände betrugen je nach Gruppe 5 bzw. 10 Stunden.

Folgende Diätzusammensetzungen wurden verwendet:

a) eine Suspension einer proteinarmen Basisdiät (Berodiät der Firma Boehringer, Mannheim) und L-Leucin (Firma Pfrimmer, Erlangen) in Wasser.

Dosierung: 1,34 g Basisdiät/Ratte/20 Stunden (8,94 g/kg/24 Stunden entsprechend 35 - 40 Kilokalorien/kg/24 Stunden).

0,6 g L-Leucin/Ratte/20 Stunden (4,0 g/kg/24 Stunden, entsprechend 16 Kilokalorien/kg/24 Stunden).

4 ml Wasser/Ratte/20 Stunden

b) eine Suspension einer proteinarmen Basisdiät (siehe a), mit alpha-Ketoisokapronsäure als Calciumsalz der Fa. Pfrimmer, Erlangen; im folgenden als Ketoleucin abgekürzt und Vitamin B_6 zur Sicherstellung der Transaminierungsreaktion (Fa. Merck, Darmstadt) in einer Mischung von Wasser und 1 % Methylzellulose.

Dosierung: 1,34 g Basisdiät/Ratte/20 Stunden
0,6 g Ketoleucin/Ratte/20 Stunden
0,04 mg Vitamin B_6/Ratte/20 Stunden
2 ml Wasser und 2 ml 1%ige Methylzelluloselösung

c) eine Suspension der Basisdiät allein als Kontrolle

Dosierung: 1,34 g Basisdiät/Ratte/20 Stunden
4 ml Wasser

Die Zugabe von Vitamin B_6 zum Ketoanalogen der Aminosäure Leucin wurde durch Ergebnisse früherer Arbeiten (15, 16) angeregt. Für die Transaminierung von Ketosäuren zu den analogen Aminsäuren wird Vitamin B_6 als Cofaktor benötigt. Außerdem besteht in der Urämie ein Vitamin B_6-Mangel (13).

In jeder Untersuchungsreihe wurde je eine Gruppe von Tieren nach 20, 40 und 60 Stunden durch eine Überdosierung von Äther getötet. Zuvor

wurden die Tiere gewogen und Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus zur Blutzucker-, Harnstoff-N- und pH-Bestimmung mit heparinisiertem Kapillarröhrchen entnommen. Danach wurden Herz, Leber und Muskel entfernt und bei -30°C eingefroren.

2.2 Analytik

2.2.1 Bestimmung der Blutwerte

Blutzucker, Harnstoff-N und pH wurden nach den üblichen Routinemethoden im Serum analysiert.

2.2.2 Kohlenhydrat- und Proteingehalt, Enzymaktivitäten der Organe

Diese Messungen wurden in einem Rohextrakt aus den Organen durchgeführt, der folgendermaßen hergestellt wurde:
Die tiefgefrorenen Organe wurden gewogen, mit dem zweieinhalbfachen Gewichtsvolumen an 4 molarer EDTA-Lösung (pH 7,0, 4°C), versetzt und 15 sec homogenisiert. Die Gewebesuspension wurde 10 Minuten bei 15.000 x g unter Kühlung bei 0°C zentrifugiert. Im Überstand (=Rohextrakt) erfolgten die oben angegebenen Bestimmungen.

a) Proteinbestimmung nach LOWRY et al. (17)

Der Leber-und Muskelproteingehalt wurde nach der Phenol-Folin-Methode(17) direkt aus dem jeweiligen Rohextrakt bestimmt.

Reagentien:

Lösung A: 2 % Na_2CO_3 in 0.1 n NaOH
Lösung B: 0,5 % $CuSO_4$ x 5 H_2O
Lösung C: 1 % Na - K - Tartrat
Lösung D: 48 ml Lösung A mit 1 ml Lösung C vermischen, schütteln und 1 ml Lösung B dazugeben
Lösung E: Folin-Reagenz, 1 : 1 mit destilliertem Wasser verdünnt.

Durchführung:
Für die Messung wurde der Rohextrakt mit dest. Wasser verdünnt (Leber- 1 : 200, Muskel 1 : 100). 0,5 ml der Probe wurden mit 5 ml Lösung D vermischt, nach 10 min. wurden 0,5 ml Lösung E dazupipettiert und nach weiteren 10 min wurde bei 578 nm die Extinktion gemessen. Zur Ermittlung des Standards wurde eine Eichkurve aus Rinderserumlösungen in einer Konzentration von 50 - 500 ug/ml hergestellt. Die aus der Extinktion erhaltenen Werte sind auf 1 ml des Rohextraktes bezogen.

b) Glykogen- und Gesamtkohlenhydratbestimmung, modfiziert nach MONTGOMERY (102)

Durchführung:
0,9 ml Rohextrakt wurden mit 0,1 ml 50 % Trichloressigsäure vermischt und kräftig geschüttelt (Endkonzentration an Säure: 5 %). Bei 4°C wurde die Mischung 10 min. inkubiert (Eisbad). Das denaturierte Eiweiß wurde dann mit einer Tischzentrifuge 10 min bei maximaler Umdrehung abzentrifugiert.

Vom Überstand wurden 0,5 ml abgenommen und daraus nach später angegebener Methode die Gesamtkohlenhydrate bestimmt.

Ein Milliliter des übrigen Überstands wurde mit 2.2 ml absoluten Äthanols versetzt, mehrmals geschüttelt und bei 4°C inkubiert (Endkonz. des Äthanols: 66 %). Nach 10 min wurde das ausgefallene Glykogen bei maximaler Umdrehung (Tischzentrifuge) abzentrifugiert (15 min). Der Überstand wurde verworfen, das Präzipitat mit 2 ml Wasser unter mehrmaligem Schütteln wieder aufgenommen.

Nach vollständiger Lösung wurden 0,2 ml 40 %iger Phenolsuspension in Wasser und 5 ml konzentrierter Schwefelsäure dazugegeben und kräftig geschüttelt. Nach 30 min wurde bei 492 nm die Extinktion der Proben im Photometer abgelesen. Der Standard wurde mittels einer Eichkurve aus Glykogenlösungen von 20 - 100 µg/ml bestimmt.

c) Messung der Glykogensynthetaseaktivität nach THOMAS et al. (19)
Reagentien:

1. 3.75 mmol ^{3}H-UDP-Glucose
(21,2 mg UDP-Glucose auf 10 ml dest.Wasser und 0.1 ml ^{3}H-UDP-Glucose)

2. Stammlösung zur Bestimmung der D- und I-Form
   4 ml 10 % Glykogenlösung
   4 ml 0,625 mol Tris/HCL, =,125 mol EDTA, 0,156 mol $MgCl_2$,
   auf pH 7,6 gepuffert
   2 ml 0,0625 Glucose - 6 - Phosphat

3. Stammlösung zur Bestimmung der I-Form
   4 ml 10 % Glykogenlösung
   4 ml 0,625 mol Tris/HCL, 0,0125 mol EDTA, 0,156 mol $MgCl_2$,
   auf pH 7,6 gepuffert
   2 ml dest. Wasser

Durchführung:
100 µl ^{3}H-UDP-Glucose wurden mit 50 µl Probe und 20 µl Stammlösung 2 bzw. 3 bei 3°C inkubiert (Wasserbad), nach 3 min wurde jeweils ein aliquot von 50 µl auf ein Wahtman - Filterplättchen gegeben und die Plättchen anschließend für 20 min in 66 % Äthanol (4°C, ohne Rühren) getaucht. Dann wurden sie 10 min in frischer Äthanollösung und 5 min in Aceton inkubiert. Nach Trocknen der Plättchen wurden sie in Szintillationsgläschen gegeben und mit je 5 ml Rotiszin 11 (Fa. Roth) versetzt. Der Leerwert berechnet sich aus einem leerem Filterplättchen in der Badeflüssigkeit (cpm_o), der Totalwert aus 5 ul ^{3}H-UDP-Glucose auf ein Filterplättchen (cpm_{total}).

Die Synthetaseaktivität wird in umgesetzten molaren Einheiten Glucose gemessen und die spezifische Aktivität des Enzyms wie folgt gemessen:

$$U/min/mg = \frac{cpm\ (Probe) \times 187{,}5 \times 20}{3 \times cpm_{total} \times mg/ml\ \ Protein}$$

d) Aktivitätsbestimmung der Glykogenphosphorylase nach Stalmans und Hers (20) in der Leber und nach Hedrick und Fischer (101) im Skeletmuskel

Reagentien:

Lösung 1: (Substrat für die Phosphorylase b in der Leber):
0,1 M Na - maleat, auf pH 6,8 eingestellt, 2 % Glykogen,
0,15 M Glucose - 1 - Phosphat, 27,6 g Na_2SO_4 auf 100 ml
dest. Wasser.

Lösung 2: (Substrat für die Phosphorylase b im Muskel):
0,1 M Na-Maleatlösung auf pH 6,8 eingestellt, 2 % Glykogen, 0,15 M Glucose - 1 - Phosphat, 2 M cAMP auf 100 ml dest. Wasser.

Lösung 3: (Substrat für die Phosphorylase a in Muskel und Leber):
0,1 M Na-Maleatlösung auf pH 6,8 eingestellt, 2 % Glykogen, 0,15 M Glucose - 1 - Phosphat auf 100 ml dest. Wasser

Stoplösung (zur Beendigung der Reaktion):
7,5 g Ammoniummolybdat, 2,7 ml 10 % SDS (Na-dodecylsulfat)
42 ml konz. Schwefelsäure in 2700 ml dest. Wasser

Farbreagenz (zur Sichtbarmachung des umgesetzten Phosphats):
148,7 g Natriumhydrogensulfit, 5,0 g Natriumsulfit,
2,5 g ANSA (1-Amino-2-hydroxynaphtalinsulfansäure)
in 4000 ml dest. Wasser gelöst

Verdünnungspuffer für die Proben:
10 ml M Trislösung, 1 ml 0,5 M DTE (Dithioerytrit)
25 ml 1 M NaF-Lösung auf pH 6,8 einstellen und auf
500 ml dest. Wasser auffüllen

Durchführung:
Die Rohextrakte wurden mit dem Verdünnungspuffer verdünnt:
Für die Phosphorylase a 1 : 20, für die Phosphorylase b 1 : 50,
zur Phosphatleerwertbestimmung 1 : 10.

Für die Bestimmungsreaktion wurden je 0,1 ml Probe mit jeweils 0,1 ml Lösung 1, 2 und 3 vermischt. Nach 10 min Inkubation bei 37°C im Wasserbad wurden 4,5 ml Stoplösung und 0,25 ml Farbreagenz dazugegeben. Bei der Phosphatleerwertbestimmung wurden 0,1 ml dest. Wasser benutzt, ansonsten war das Vorgehen identisch. Die geschüttelten Proben wurden noch 30 min bei Zimmertemperatur stehengelassen und dann bei 578 nm die Extinktion bestimmt. Als Standard diente eine käufliche Phosphateichlösung. Die Aktivität wurde in Einheiten umgesetzten Phosphats angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Gewichtsänderungen, Serumharnstoff- und Blutzuckerspiegel

Die postoperativen Gewichtsänderungen der Tiere sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Die scheinoperierten Kontrollen verlieren von 6 % nach 20 Stunden bis zu 13 % nach 60 Stunden erheblich an Gewicht. Dies ist die Folge des Stresszustandes, in dem sich die Tiere während der Versuchsdurchführung befanden. Dieser starke Katabolismus konnte auch durch die hochkalorische Ernährung, je nach Diät 50 - 60 kcal/kg täglich nicht ausgeglichen werden. Der geringe Gewichtsverlust der urämischen Tiere, von 0 bis 4 % Abnahme, läßt sich auf die stark verringerte Ausscheidungsfähigkeit zurückführen. Ihr Substanzverlust kann bei Einbeziehung der gefütterten Mengen, von 5 g bis 18 g je nach Diät und Untersuchungsdauer, mit dem der Kontrollen verglichen werden.

Das Verhalten des Harnstoff - N ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Für scheinoperierte Kontrollen liegen die Werte zwischen 18 und 29 mg/dl. Bereits 20 Stunden nach Binephrektomie liegt der Harnstoff - N unter Verfütterung der proteinarmen Diät bei 115 mg/dl, nach zusätzlicher Leucingabe bei 145 mg/dl, nach Ketoleucinapplikation bei 181 mg/dl. 0 Stunden nach Binephrektomie liegen die Mittelwerte in den 3 untersuchten Gruppen bei 10-stündigem Fütterungsintervall zwischen 303 und 327 mg/dl. 60 Stunden nach Binephrektomie ergibt sich nach Leucinapplikation im 10-Stunden-Intervall ein Wert von 662 mg/dl, Vergleichswert bei 5-stündiger Leucinverfütterung 473 mg/dl. Die adäquaten Werte unter proteinarmer Diät und Ketoleucingabe liegen in beiden Fällen bei 404 mg/dl.

Der Blutzucker der Tiere ist in Tabelle 3 wiedergegeben. Die Werte für scheinoperierte Tiere liegen in allen 3 Vergleichsgruppen zwischen 79 und 110 mg/dl. Bei den binephrektomierten Tieren kommt es unter Leucinverfütterung im 10-Stunden- bzw. 5-Stunden-Intervall zu einem kontinuierlichen Anstieg des Blutzuckers von der 20. bis zur 60. Stunde auf maximal 122 mg/dl, bzw. 155 mg/dl. Ureterligierte Tiere fallen unter Ketoleucinverfütterung von der 20. bis zur 60. Stunde kontinuierlich von 103 auf 79 mg/dl ab.

Gewichtsänderungen (in % der Ausgangsgewichte):

Tab. 1

	Fütt.-Inter.		nach 20	40	60 h
MLPD	SOP	10	- 6.0	- 8.0	- 12.1
	BN	10	- 3.0	- 4.0	- 4.3
+ KIC	SOP	10	- 7.1	-11.2	- 13.4
	BN	10	- 1.1	- 3.9	-
	UL	10	- 2.2	- 2.7	- 3.9
+ LEU	SOP	10	- 7.6	- 9.6	- 10.3
	BN	10	- 1.1	- 2.6	- 3.2
	SOP	5	- 8.6	- 9.0	- 13.9
	BN	5	- 1.5	- 2.1	0.0

Harnstoff - N Gehalt des Serums (mg/dl)

Tab. 2

	Fütt.-Inter.		20 h	nach 40 h	60 h
MLPD	SOP	10	25	18	19
	BN	10	115	303	404
+ KIC	SOP	10	25 ± 5.8	26 ± 1.4	27 ± 6.9
	BN	10	181 ± 9.4	327 ± 37.2	-
	UL	10	172 ± 9.1	299 ± 22.4	404 ± 26.6
+ LEU	SOP	10	25 ± 2.7	28 ± 2.7	28 ± 2.2
	BN	10	145 ± 16.3	310 ± 12.2	662 ± 40.8
	SOP	5	20 ± 2.9	20 ± 2.2	22 ± 4.8
	BN	5	179 ± 8.9	305 ± 22.4	473 ± 42.2

Blutzuckerspiegel (mg/dl)

Tab. 3

		Fütt.-Inter., h			
MLPD	SOP	10	110	94	96
	BN	10	84	88	92
+ KIC	SOP	10	96 ± 13.6	97 ± 2.6	105 ± 11.5
	BN	10	89 ± 18.7	108 ± 18.9	-
	UL	10	103 ± 9.9	99 ± 8.7	79 ± 6.1
+ LEU	SOP	10	79 ± 9.6	80 ± 8.1	80 ± 5.1
	BN	10	101 ± 7.5	103 ± 4.1	122 ± 14.5
	SOP	5	101 ± 14.5	107 ± 8.9	112 ± 20.0
	BN	5	102 ± 14.6	120 ± 21.4	155 ± 18.4

3.2 Proteingehalt von Leber und Muskel

Der Leberproteingehalt ist in Tabelle 4 dargestellt. In den ersten 40 Stunden bleibt bei scheinoperierten (52 mg Protein/ml Rohextrakt) wie bei binephrektomierten Ratten (43 mg Protein/ml Rohextrakt) unter Verfütterung der proteinarmen Diät der Leberproteingehalt konstant. In beiden Gruppen erfolgt in den letzten 20 Stunden ein Anstieg des Leberproteins auf 74 bzw. 71 mg/ml. Leucin verdoppelt im Vergleich dazu den Leberproteingehalt in den ersten 40 Stunden sowohl bei 10-stündigem als auch bei 5-stündigem Fütterungsintervall und bleibt dann konstant. Die Vergleichswerte nach Ketoleucingabe liegen unter den durch Leucinapplikation erzielbaren, aber über den unter proteinarmer Basisdiät erzielten Ergebnissen.

Das Verhalten des Muskelproteingehaltes ist in Tabelle 5 wiedergegeben. Der Muskelproteingehalt bleibt im untersuchten Zeitraum bei scheinoperierten und binephrektomierten Ratten konstant (im Mittel 17 mg Protein/ml Rohextrakt). Wiederum läßt sich unter hochdosierter Leucinverfütterung eine Verdopplung des Proteingehaltes erzielen. Die Werte unter 5-stündiger Leucinapplikation übersteigen diejenigen im 10-stündigen Fütterunsintervall gemessenen Proteinkonzentrationen. Bei scheinoperierten Ratten mit Ketoleucinsubstitution kommt es von der 20. bis zur 60. Stunde zu einem kontinuierlichen Abfall des Muskelproteins von 20.7 auf 14.9 mg/ml, während nach Ureterligatur die Muskelproteinkonzentrationen von 15.6 auf 24.2 mg Protein/ml Rohextrakt ansteigt. Wiederum liegen die durch Ketoleucin induzierbaren Proteinkonzentrationen im Muskel unter den durch Leucingabe erzielbaren Ergebnissen.

Der Proteingehalt von Leber und Muskel (mg/ml Rohextrakt)

Tab. 4

Leber

	Fütterungs-intervall		nach 20 h	nach 40 h	nach 60 h
MLPD	SOP	10	53.7	51.2	74.3
	BN	10	43.0	43.2	71.0
+ KIC	SOP	10	74.8 ± 6.8	72.6 ± 8.7	86.3 ± 6.4
	BN	10	79.1 ± 12.1	66.0 ± 4.6	-
	UL	10	78.5 ± 22.1	77.2 ± 12.7	73.4 ± 15.1
+ LEU	SOP	10	98.5 ± 12.9	97.6 ± 21.0	97.4 ± 20.7
	BN	10	115 ± 11.5	91.5 ± 9.6	83.2 ± 14.5
	SOP	5	104 ± 3.7	104 ± 2.4	97.0 ± 2.8
	BN	5	99.4 ± 22.1	86.9 ± 8.4	121 ± 16.9

Tab. 5

Muskel

	Fütterungs-intervall		nach 20 h	nach 40 h	nach 60 h
MLPD	SOP	10	14.7	18.4	16.6
	BN	10	16.9	20.8	14.9
+ KIC	SOP	10	20.7 ± 4.1	18.0 ± 2.1	14.9 ± 1.9
	BN	10	23.7 ± 1.9	17.8 ± 3.1	-
	UL	10	15.6 ± 2.1	22.3 ± 1.6	24.2 ± 4.3
+ LEU	SOP	10	30.5 ± 2.1	21.7 ± 4.8	18.7 ± 3.6
	BN	10	32.0 ± 5.0	25.8 ± 8.4	34.1 ± 6.8
	SOP	5	32.6 ± 3.4	34.6 ± 0.6	31.6 ± 3.0
	BN	5	37.6 ± 4.6	33.2 ± 6.7	36.8 ± 4.3

3.3 Glykogengehalt von Leber und Muskel

Der Glykogengehalt der Leber ist in Tabelle 6 dargestellt. Betrachtet man den Glykogengehalt der Leber, so wird deutlich, daß in allen untersuchten Gruppen bei 10-stündigem und 5-stündigem Fütterungsintervall die gemessenen Konzentrationen weit unter den Werten unbehandelter Kontrollen liegen. Bei 10-stündiger Leucinfütterung liegt die Glykogenkonzentration der Leber im Mittel bei 20 µg Glykogen/ml Rohextrakt akt. Lediglich die Verkürzung der Fütterungszeit auf ein 5-Stunden-Intervall läßt den Leberglykogengehalt von 16 auf 133 µg/ml nach Binephrektomie im untersuchten Zeitraum ansteigen. Bis zu 10-fach verringerte Glykogenkonzentrationen finden sich im Vergleich dazu unter Ketoleucinsubstitution.

Der Glykogengehalt des Muskels wird in Tabelle 7 wiedergegeben. Im wesentlichen verhält sich der Muskelglykogengehalt den Leberwerten vergleichbar. Bei 10-stündiger Leucinfütterung bewegt sich die Glykogenkonzentration aller Gruppen im Mittel bei 5 µg/ml Rohextrakt. Als einzige Ausnahme erhöht sich bei 5-stündigem Fütterungsintervall die Glykogenkonzentration nach Scheinoperation im Mittel auf 38 µg/ml. Die Vergleichswerte unter proteinarmer Basisdiät und unter Ketoleucinsubstitution sind im Mittel 6 bzw. 3 µg Glykogen/ml Rohextrakt.

Das Verhältnis von Glykogen zu Protein in Leber und Muskel wird in Tabelle 8 dargestellt. Der Glykogengehalt pro mg Protein liegt unter proteinarmer Basisdiät bei fast allen Gruppen weit über den vergleichbaren Werten unter Leucinfütterung. Eine Ausnahme bilden die 5-stündlich mit Leucin gefütterten Ratten nach Scheinoperation, die in der Leber der Kontrollgruppe ähnliche und im Muskel ums Doppelte erhöhte Werte zeigen. Unter Ketoleucinsubstitution besitzen die urämischen Tiere einen im Vergleich zum Protein verschwindend geringen Glykogenanteil. Zwischen Leber und Muskel bestehen keine gravierenden Unterschiede.

Der Glykogengehalt von Leber und Muskel (µg/ml Rohextrakt)

Tab. 6

Leber

	Fütterungs-intervall	20 h	nach 40 h	60 h
MLPD	SOP 10	25.0	19.2	90.9
	BN 10	17.6	13.4	12.0
+ KIC	SOP 10	8.05 ± 4.4	8.66 ± 4.2	55.6 ± 35.3
	BN 10	1.18 ± 0	6.08 ± 3.7	-
	UL 10	2.19 ± 1.7	6.91 ± 2.3	3.23 ± 1.1
+ LEU	SOP 10	69.0 ± 35.0	16.3 ± 3.1	26.4 ± 19.7
	BN 10	17.0 ± 7.0	15.0 ± 2.2	17.6 ± 3.3
	SOP 5	51.3 ± 14.7	45.8 ± 18.4	41.9 ± 19.1
	BN 5	15.6 ± 3.0	73.5 ± 23.5	133 ± 61.6

Tab. 7

Muskel

	Fütterungs-intervall	20 h	nach 40 h	60 h
MLPD	SOP 10	6.60	5.30	4.58
	BN 10	7.70	6.20	6.78
+ KIC	SOP 10	1.18 ± 0	5.19 ± 1.7	4.53 ± 1.2
	BN 10	1.18 ± 0	6.10 ± 3.7	-
	UL 10	3.45 ± 2.00	2.83 ± 0	3.33 ± 2.4
+ LEU	SOP 10	32.0 ± 5.0	4.62 ± 2.3	4.31 ± 2.7
	BN 10	7.41 ± 2.8	3.33 ± 1.7	4.85 ± 1.0
	SOP 5	32.0 ± 5.0	43.0 ± 9.0	38.0 ± 17.0
	BN 5	7.06 ± 1.5	2.45 ± 0.8	7.51 ± 3.0

Der Glykogen / Protein - Quotient (µg/mg Protein)

Tab. 8

	Fütterungs-	intervall	Leber nach 20 h	40 h	60 h	Muskel nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	0.45	0.38	1.22	0.45	0.29	0.28
	BN	10	0.41	0.31	0.17	0.46	0.30	0.46
+ KIC	SOP	10	0.11	0.12	0.64	0.06	0.29	0.30
	BN	10	0.02	0.09		0.02	0.09	-
	UL	10	0.03	0.09	0.04	0.22	0.13	0.14
+ LEU	SOP	10	0.70	0.17	0.27	1.07	0.21	0.23
	BN	10	0.15	0.16	0.21	0.31	0.13	0.14
	SOP	5	0.49	0.44	0.43	0.98	1.24	1.20
	BN	5	0.16	0.85	0.09	0.19	0.07	0.20

3.4 Gesamtkohlenhydratgehalt von Leber und Muskel

Der Gesamtkohlenhydratgehalt der Leber wird in Tabelle 9 wiedergegeben. Wird der Gesamtkohlenhydratgehalt der Leber unter unterschiedlichen Substitutionsbedingungen analysiert, so sieht man nach Binephrektomie unter 10-stündiger Leucinverfütterung einen Anstieg von 1.97 auf 5.70 mg/ml Rohextrakt im untersuchten Zeitraum, der den der scheinoperierten Ratten übertrifft. Dagegen liegen die Vergleichswerte der Ketoleucin-substituierten, ureterligierten Tiere zwischen 0.63 und 1.91 mg/ml. Die 5-stündige Verfütterung von Leucin läßt nach Binephrektomie den Gesamtkohlenhydratgehalt der Leber von 2.1 auf 10.1 mg/ml Rohextrakt steigen, während die vergleichbaren scheinoperierten Tiere im Mittel konstant bei 2.97 mg/ml lagen.

In Tabelle 10 wird der Gesamtkohlenhydratgehalt des Muskels dargestellt. Unter Leucinfütterung bleibt der Gesamtkohlenhydratgehalt des Muskels nach Binephrektomie während des untersuchten Zeitraums bei im Mittel 2.87 mg/ml Rohextrakt konstant. Dagegen zeigt sich bei fünfstündlichem Fütterungsintervall ein leichter Abfall von 4.29 auf 3.67 mg/ml. Die Werte der scheinoperierten Gruppen liegen in beiden Fällen unter den der urämischen Tiere. Bei Ketoleucinsubstitution beträgt der Gesamtkohlenhydratgehalt des Muskels zum Teil nur ein Viertel der mit Leucin gefütterten Tiere. Nach Ureterligatur fällt er von 0.72 auf 0.44 mg/ml Rohextrakt ab.

Das Verhältnis von Gesamtkohlenhydratgehalt zu Protein in Leber und Muskel ist in Tabelle 11 wiedergegeben. In der Leber nimmt der Gesamtkohlenhydratgehalt pro mg Protein unter Leucinfütterung nach Binephrektomie bei 10-stündlichem Fütterungsintervall von 17.1 auf 68.5 µg Gesamtkohlenhydrate pro mg Protein zu, bei 5-stündlichem Intervall von 21.1 auf 83.5 µg/mg Protein. Die vergleichbaren Kontrollgruppen unter proteinarmer Basisdiät fallen dagegen von 73.0 auf 14.1 µg/mg Protein ab. Bei Ketoleucinsubstitution liegt der Kohlenhydratanteil stets unter 30 µg/ml.
Im Muskel bewegt sich der Gesamtkohlenhydratanteil unter Leucinfütterung nach Binephrektomie bei 10-stündlichem Fütterungsintervall im Mittel um 92.2 µg/mg Protein, bei 5-stündlichem Intervall bei 107 µg/mg Protein. Ketoleucinsubstitution läßt die Werte nach Ureterligatur von 46.2 auf 18.2 µg/mg Protein absinken.

Gesamtkohlenhydratgehalt (mg/ml) von Leber und Muskel

Tab. 9

Leber

	Fütterungs-intervall		nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	3.11	3.14	5.56
	BN	10	3.14	1.85	1.58
+ KIC	SOP	10	1.80 ± 0.6	3.18 ± 0.6	4.26 ± 1.4
	BN	10	0.91 ± 0.3	1.49 ± 0.7	-
	UL	10	0.63 ± 0.2	1.69 ± 0.3	1.91 ± 1.0
+ LEU	SOP	10	2.46 ± 0.3	3.18 ± 0.6	4.26 ± 1.4
	BN	10	1.97 ± 0.5	2.38 ± 0.8	5.70 ± 1.4
	SOP	5	3.10 ± 0.8	2.77 ± 0.7	3.04 ± 2.1
	BN	5	2.10 ± 0.6	3.17 ± 1.2	10.1 ± 1.5

Tab. 10

Muskel

MLPD	SOP	10	0.50 ± 0.3	1.06 ± 0.4	0.90 ± 0.1
+ KIC	BN	10	0.34 ± 0.2	3.91 ± 2.4	-
	UL	10	0.72 ± 0.1	0.54 ± 0.3	0.44 ± 0.3
+ LEU	SOP	10	1.46 ± 0.4	2.34 ± 0.5	2.69 ± 1.0
	BN	10	2.92 ± 0.4	2.56 ± 0.5	3.13 ± 0.2
	SOP	5	1.88 ± 0.3	1.99 ± 0.6	1.76 ± 1.0
	BN	5	4.29 ± 0.5	3.72 ± 0.1	3.67 ± 0.4

Der Gesamtkohlenhydrat / Protein - Quotient (µg/mg Protein)

Tab. 11

	Fütterungs-intervall		Leber nach 20 h	40 h	60 h	Muskel nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	57.9	61.3	74.8	-	-	-
	BN	10	73.0	42.8	14.1	-	-	-
+ KIC	SOP	10	32.9	33.7	72.7	24.2	58.7	60.4
	BN	10	11.5	22.6		14.3	220	-
	UL	10	8.0	21.9	26.0	46.2	24.2	18.2
+ LEU	SOP	10	18.3	32.6	43.7	48.0	108	144
	BN	10	17.1	26.0	68.5	91.5	93.2	91.8
	SOP	5	29.8	26.6	31.3	57.7	37.5	55.7
	BN	5	21.1	36.5	83.5	114	108	99.7

3.5 Glykogenphosphorylaseaktivität von Leber und Muskel

Die Aktivität des Gesamtenzyms Glykogenphosphorylase ist für die Leber in Tabelle 12 dargestellt.
Bei den scheinoperierten Kontrolltieren kommt es unter Leucinapplikation zu einem kontinuierlichen Anstieg der Gesamtaktivität des Enzyms von 116 ± 22 nmol Phosphat pro min und mg Protein nach 20 Stunden auf 279 ± 91 nmol pro min und mg Protein nach 60 Stunden. Ein vergleichbarer Anstieg findet sich bei den binephrektomierten Vergleichstieren im 10-stündigen Fütterungsintervall. Scheinoperierte, im 5-Stunden-Abstand gefütterte Leucintiere dagegen liegen mit ihrer Phosphorylaseaktivität konstant bei 120 nmol/min und mg Protein. Bei den binephrektomierten Vergleichstieren fällt die Gesamtaktivität von 158 auf 104 nmol/min und mg Protein ab. Wesentlich höhere Phosphorylaseaktivitäten (bis zu 5-fach) finden sich bei scheinoperierten, nephrektomierten und ureterligierten Ratten unter Ketoleucinsubstitution.

Die Gesamtaktivität der Glykogenphosphorylase im Muskel wird in Tabelle 13 wiedergegeben.
Betrachtet man die Gesamtaktivität der Phosphorylase im Skeletmuskel, so zeigt sich, daß bei scheinoperierten Tieren die spezifische Aktivität des Enzyms unter Verfütterung der proteinarmen Diät allein und unter zusätzlicher Applikation von Leucin um 2000 nmol/min und mg Protein liegt. Etwas höhere Werte werden nach Ketoleucinsubstitution gemessen. Nach Binephrektomie geht die spezifische Aktivität des Enzyms bei den mit Leucon gefütterten Gruppen auf 700 nmol/min und mg Protein zurück, während bei den mit Ketoleucin gefütterten Vergleichstieren die Enzymaktivitäten ca. 3-fach höher bleiben. Lediglich nach Ureterligatur kommt es unter Ketoleucinapplikation nach 60 Stunden zu einem Abfall der Enzymaktivität auf 1201 nmol/min und mg Protein.

Die Aktivität des aktiven Teils der Glykogenphosphorylase, der Phosphorylase a in der Leber wird in Tabelle 14 dargestellt.
Unter Leucinverfütterung bewegt sich die Aktivität des aktiven Teils der Glykogenphosphorylase bei 10-stündlichem Fütterungsintervall nach Nephrektomie im Mittel bei 71 nmol/min und mg Protein, während sie sich bei 5-stündlichem Fütterungsintervall von 84 auf 42 nmol pro min und mg

Protein verringert. Die scheinoperierten, mit Leucin gefütterten Gruppen lassen die Enzymaktivität auf 135 nmol/min und mg Protein nach 60 Stunden im 10-stündlichem Fütterungsintervall steigen, im 5-stündlichem Intervall bleibt sie bei 48 nmol/min und mg im Mittel. Bei Ketoleucinsubstitution liegen die Enzymaktivitäten bis zu 4-mal so hoch, fallen aber von der 20. bis zur 60. Stunde ab, nach Ureterligatur von 180 auf 129 nmol/min und mg Protein, nach Scheinoperation von 182 auf 142 nmol/min und mg.

Das Verhalten des aktiven Enzymanteils der Glykogenphosphorylase im Muskel ist in Tabelle 15 wiedergegeben.
Die Enzymaktivität aller Grupen mit Ketoleucinsubstitution liegt zwischen 945 und 1380 nmol Phosphat/min und mg Protein, lediglich 60 Stunden nach Ureterligatur sinkt sie auf 674 $\pm$ 397 nmol/min und mg Protein. Bei Leucinverfütterung zeigen nur die scheinoperierten Gruppen bei 10-stündlichem Fütterungsintervall einen ähnlich hohen mittleren Wert von 692 nmol/min und mg Protein. Die Vergleichsgruppen nach Binephrektomie liegen im Mittel bei 265 nmol/min und mg Protein. Bei den 5-stündlich mit Leucin gefütterten Ratten fallen die Enzymaktivitäten von 57 auf 43 nmol/min und mg Protein ab. Die nephrektomierten Tiere der Vergleichsgruppen liegen im Mittel bei 268 nmol/min und mg Protein.

Die Gesamtenzymaktivität in Bezug zum Gesamtkohlenhydratgehalt in Leber und Muskel ist in Tabelle 16 wiedergegeben.
In der Leber bewegen sich die Gesamtenzymaktivitäten pro mg Gesamtkohlenhydratgehalt unter Leucinfütterung in den scheinoperierten Kontrollgruppen bei 10-stündlicher Fütterung im Mittel bei 5.6 µmol/Phosphat/min und mg Gesamtkohlenhydratgehalt, bei 5-stündlicher Fütterung bei 4.1 µmol. In den binephrektomierten Vergleichsgruppen fallen die Enzymaktivitäten bei 10-stündlichem Fütterungsintervall von 8.1 auf 3.1 µmol/min und mg Gesamtkohlenhydratgehalt, bei 5-stündlichem Intervall von 7.5 auf 1.3 µmol. Unter Ketoleucinsubstitution zeigen sich ähnlich niedrige Werte nur bei scheinoperierten Tieren, die von 9.4 µmol nach 20 Stunden auf 3.60 µmol/min und mg nach 60 Stunden sinken. Bei Binephrektomie liegen die Enzymaktivitäten bei 30.2 µmol nach 20 Stunden und 24.5 µmol/min und mg nach 40 Stunden. Die ureterligierte Vergleichsgruppe

weist von 38.3 µmol auf 10.0 µmol/min und mg sinkende Werte im untersuchten Zeitraum auf.
Im Muskel bewegen sich die Enzymaktivitäten im Verhältnis zum Gesamtkohlenhydratgehalt in den nephrektomierten mit Leucin gefütterten Gruppen bei ca. 7.4 µmol/min und mg Gesamt-KH-Gehalt, die scheinoperierten Vergleichsgruppen liegen um ca. 10 µmol höher. Unter Ketoleucinfütterung schwanken die Aktivitäten des Gesamtenzyms in allen untersuchten Gruppen zwischen 38 und 184 µmol/min und mg, also ca. 3-10-fach höher als bei Leucinsubstitution.

Den Gehalt an aktiver Glykogenphosphorylase a auf die Gesamtkohlenhydrate bezogen in Leber und Muskel gibt Tabelle 17 wieder.
Die Werte in der Leber fallen in den nephrektomierten Gruppen unter Leucinfütterung von ca. 4 µmol auf im Mittel 0.8 µmol/min und mg Gesamt-KH-Gehalt nach 60 Stunden ab. Die scheinoperierten Tiere liegen bei 10-stündigem Fütterungsintervall bei 2.3 µmol, bei 5-stündigem Intervall bei 1.7 µmol/min und mg. Ketoleucinfütterung ruft nach Scheinoperation eine Verminderung des Phosphorylasegehalts von 5.8 µmol nach 20 Stunden auf 2.0 µmol/min und mg nach 60 Stunden hervor, bei den binephrektomierten Tieren von 18.5 nach 20 Stunden auf 8.6 µmol nach 40 Stunden, bei den ureterligierten Ratten von 22.5 nach 20 Stunden auf 5.0 µmol/min und mg nach 60 Stunden. Im Muskel weisen die binephrektomierten und im 5-Stundenintervall gefütterten Tiere unter Leucinfütterung die geringste Phosphorylaseaktivität pro mg Gesamt-KH-Gehalt auf, im Mittel 2.1 µmol/min und mg. Die 10-stündlich gefütterten scheinoperierten Vergleichstiere liegen etwas höher. Bei Ketoleucinfütterung ergeben sich für die untersuchten Gruppen erheblich höhere Werte zwischen 16 und 94.8 µmol/min und mg.

Der prozentuale Anteil der aktiven Phosphorylase a am Gesamtphosphorylasegehalt wird in Tabelle 18 dargestellt.
In der Leber zeigen die mit proteinarmer Basisdiät gefütterten Tiere den höchsten Anteil an aktiver Phosphorylase mit über 60 %. Gleich danach liegen die mit Ketoleucin substituierten Tiere, deren binephrektomierten Vergleichsgruppen einen Anteil von ca. 60 % und die Scheinoperierten einen von im Mittel 55 % aufweisen. Nach Ureterligatur verringert

sich der aktive Enzymanteil von 58.8 % nach 20 Stunden auf 49.2 % nach 60 Stunden. Sehr viel weniger aktive Phosphorylase enthält die Leber der mit Leucin gefütterten Ratten, der aktive Anteil liegt hier nach Scheinoperation bei ca. 39 %, bei binephrektomierten Tieren im 10-Stunden-Intervall sinkt er von 50.2 % nach 20 Stunden auf 33.2 % nach 60 Stunden und im 5-Stunden-Intervall wird ein mittlerer Wert von 43.8 % erreicht.

Im Muskel wird der niedrigste Anteil an Phosphorylase a wie in der Leber unter Leucinverfütterung gesehen. Er liegt im Mittel über alle Gruppen bei ca. 36 %. Unter Ketoleucinsubstitution fällt der aktive Anteil in den scheinoperierten Gruppen über den untersuchten Zeitraum von 50.3 auf 38.5 % ab. Bei den binephrektomierten Tieren steigt er bis zur 40. Stunde auf 55.4 %, nach Ureterligatur von 49.1 % nach 20 Stunden auf 56.1 % nach 60 Stunden.

Die Glykogenphosphorylaseaktivität von Leber und Muskel
(nmol Phosphat /min und mg Protein)

Der Gesamtenzymgehalt

Tab. 12
Leber

	Fütterungs-intervall		nach 20 h	nach 40 h	nach 60 h
MLPD	SOP	10	-	-	315 ± 77
	BN	10	-	-	313 ± 28
+ KIC	SOP	10	310 ± 39	394 ± 53	258 ± 33
	BN	10	347 ± 66	554 ± 44	
	UL	10	306 ± 74	306 ± 41	260 ± 106
+ LEU	SOP	10	116 ± 23	132 ± 26	279 ± 92
	BN	10	139 ± 23	188 ± 41	209 ± 39
	SOP	5	117 ± 20	121 ± 9	122 ± 26
	BN	5	158 ± 52	137 ± 25	104 ± 25

Tab. 13
Muskel

MLPD	SOP	10	-	-	1993 ± 333
	BN	10	-	-	2310 ± 431
+ KIC	SOP	10	2416 ± 727	2230 ± 177	2531 ± 225
	BN	10	2633 ± 513	1706 ± 114	-
	UL	10	2387 ± 195	2588 ± 269	1201 ± 485
+ LEU	SOP	10		1911 ± 450	2212 ± 199
	BN	10	691 ± 61	686 ± 38	801 ± 75
	BN	10	705 ± 68	785 ± 225	745 ± 182

Der Gehalt an aktiver Phosphorylase
(nmol Phosphat/min und mg Protein)

Tab. 15
Muskel

	Fütterungs-intervall		20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	-	-	654 ± 147
	BN	10	-	-	1032 ± 133
+ KIC	SOP	10	1215 ± 326	975 ± 87	-
	BN	10	1356 ± 223	945 ± 70	-
	UL	10	1171 ± 103	1380 ± 229	674 ± 397
+ LEU	SOP	10	713 ± 135	639 ± 127	723 ± 164
	BN	10	272 ± 28	240 ± 18	284 ± 24
	SOP	5	57 ± 7	51.3± 9	43 ± 12
	BN	5	228 ± 29	374 ± 82	202 ± 48

Tab. 14
Leber

MLPD	SOP	10	-	-	207 ± 53
	BN	10	-	-	194 ± 58
+ KIC	SOP	10	182 ± 17	207 ± 29	142 ± 19
	BN	10	213 ± 44	194 ± 40	-
	UL	10	180 ± 56	182 ± 63	129 ± 55
+ LEU	SOP	10	43 ± 15	43 ± 8	135 ± 34
	BN	10	70 ± 13	73 ± 47	69.4± 16
	SOP	5	47 ± 15	51 ± 4	46.9± 9
	BN	5	84 ± 27	51 ± 2	42.4± 8

Der Glykogenphosphorylase-Gesamtkohlenhydrat-Quotient
(µmol Phosphat pro min und mg Gesamtkohlenhydratgehalt)
Der Gesamtenzymgehalt

Tab. 16

	Fütterungs-intervall		Leber nach 20 h	40 h	60 h	Muskel nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	-	-	4.2	-	-	7.4
	BN	10	-	-	22.2	-	-	23.7
+ KIC	SOP	10	9.4	11.7	3.6	99.8	38.0	41.9
	BN	10	30.2	24.5		184	7.8	-
	UL	10	38.3	14.0	10.0	51.7	107	66.0
+ LEU	SOP	10	6.3	4.1	6.4	-	17.7	15.4
	BN	10	8.1	7.2	3.1	7.6	7.4	8.7
	SOP	5	3.9	4.6	3.9	-	-	-
	BN	5	7.5	3.8	1.3	6.2	7.3	7.5

Der Gehalt an aktiver Phosphorylase a

Tab. 17

	Fütterungs-intervall		Leber nach 20 h	40 h	60 h	Muskel nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	-	-	2.8	-	-	2.44
	BN	10	-	-	13.8	-	-	10.6
+ KIC	SOP	10	5.5	6.1	2.0	50.2	16.6	16.1
	BN	10	18.5	8.6	-	94.8	4.3	
	UL	10	22.5	8.3	5.0	25.3	57.0	37.0
+ LEU	SOP	10	2.4	1.3	3.1	14.9	5.9	5.0
	BN	10	4.1	2.8	1.0	3.0	2.6	3.1
	SOP	5	1.6	1.9	1.5	1.0	1.4	0.8
	BN	5	4.0	1.4	0.5	2.0	3.5	2.0

Der Anteil der aktiven Phosphorylase am Gesamtphosphorylasegehalt in Prozent

Tab. 18

	Fütterungs-intervall		Leber, nach 20 h	Leber, nach 40 h	Leber, nach 60 h	Muskel, nach 20 h	Muskel, nach 40 h	Muskel, nach 60 h
MLPD	SOP	10	-	-	65.7	-	-	32.8
	BN	10	-	-	62.0	-	-	44.7
+ KIC	SOP	10	58.7	52.5	55.0	50.3	43.7	38.5
	BN	10	61.4	58.9	-	51.5	55.4	-
	UL	10	58.8	59.4	49.2	49.1	53.3	56.1
+ LEU	SOP	10	37.2	32.7	44.3	-	33.4	38.5
	BN	10	50.2	38.6	33.2	39.4	35.0	35.5
	SOP	5	40.2	41.7	38.5	-	-	-
	BN	5	53.3	37.3	40.8	32.5	48.4	27.4

3.6 Glykogensynthetaseaktivität von Leber und Muskel

Die Gesamtsynthetaseaktivität (D+I-Form) in der Leber wird in Tabelle 19 dargestellt.
Unter 10-stündlicher Leucinfütterung kommt es sowohl bei scheinoperierten, wie auch bei nephrektomierten Ratten zu einem kontinuierlichen Anstieg der Glykogensynthetaseaktivität im untersuchten Zeitraum. Auch beim 5-Stunden-Fütterungsintervall ist nach Binephrektomie ein Anstieg zu bemerken, während die Aktivitätder scheinoperierten Tiere leicht abfällt. Ketoleucinverfütterung bewirkt eine Abnahme der spezifischen Aktivitäten mit zunehmender Urämiedauer. Die höchsten Aktivitäten weisen die mit proteinarmer Basisdiät gefütterten Gruppen nach Scheinoperation auf, die binephrektomierten Vergleichsgruppen liegen in der gleichen Größenordnung wie die bereits besprochenen Tiere.

Die Gesamtglykogensynthetaseaktivität im Muskel wird in Tabelle 20 wiedergegeben.
Erhebliche Anstiege der Synthetaseaktivitäten von der 20. bis zur 60. Stunde zeigen die 10-stündlich mit Leucin gefütterten Gruppen. Im 5-stündlichen Fütterungsintervall dagegen fallen die Werte nach Scheinoperation bis zur 60. Stunde ab, während sie bei den binephrektomierten Tieren um im Mittel 3.2 nmol Glucose pro min und mg Protein schwanken. Ein konstantes Verhalten der Synthetaseaktivität kann nach Scheinoperation bei den mit proteinarmer Basisdiät gefütterten Ratten beobachtet werden, deren mittlerer Wert bei 6.1 nmol/min und mg Protein liegt. In den binephrektomierten Gruppen fallen die Aktivitäten rasch von 6.64 auf 1.12 nmol/min und mg Protein ab. Unter Ketoleucinsubstitution liegt der Synthetasegehalt nach Scheinoperation um ca. 4.5 nmol/min und mg Pr., nach Ureterligatur sinkt er im untersuchten Zeitraum um die Hälfte ab.

Die Aktivitäten der Glykogensynthetase I, der aktiven Form, werden für die Leber in Tabelle 21 wiedergegeben.
Unter Leucinverfütterung steigt die Aktivität der Synthetase I bei allen Vergleichsgruppen an. Der höchste Wert wird mit 1.01 nmol/min und mg Protein bei den zehnstündlich gefütterten nephrektomierten Tieren erreicht. Wesentlich niedrigere Werte zeigen die Ratten unter Ketoleucinsubstitution, während die nur mit proteinarmer Basisdiät gefütterten Tiere eine Aktivität zwischen 0.52 und 0.92 nmol/min und mg Protein aufweisen.

Die Aktivität der Glykogensynthetase I im Skeletmuskel ist in Tabelle 22 dargestellt.
Unter Leucinsubstitution zeigt sich im 10-stündigen Fütterungsintervall ein Anstieg des Enzyms mit zunehmender Versuchsdauer, scheinoperierte Tiere von 0.9 auf 4.6 nmol/min und mg, binephrektomierte Tiere von 1.9 auf 3.1 nmol/min und mg. Im 5-stündlichen Intervall dagegen nehmen die Aktivitäten von 2.95 auf 0.9 nmol/min und mg nach Scheinoperation ab und bleiben nach Binephrektomie bei ca. 2.6 nmol/min und mg konstant. Nach Ketoleucinsubstitution kommt es zu einem Rückgang der spezifischen Aktivität der Glykogensynthetase I bei ureterligierten Tieren von 4.9 auf 1.9 nmol/min und mg, während sie bei den scheinoperierten Ratten bei im Mittel 3.7 nmol/min und mg konstant bleibt.

Die Glykogensynthetaseaktivität, D + I-Form, auf den Gesamtkohlenhydratgehalt bezogen, wird in Tabelle 23 für Leber und Muskel wiedergegeben. In der Leber zeigen sich bei allen urämischen Gruppen unter Leucin- und Ketoleucinsubstitution eine starke Verminderung der Enzymaktivität pro min und mg Gesamtkohlenhydraten von der 20. bis zur 60. Stunde. Im Gegensatz dazu steigt die spezifische Aktivität der Gesamtsynthetase unter proteinarmer Basisdiät bei den nephrektomierten Tieren von 10.7 auf 70.2 nmol/min und mg Gesamt-KH-Gehalt. Bei den scheinoperierten Vergleichsgruppen liegen die Aktivitäten unter proteinarmer Basisdiät bei ca. 28 nmol/min und mg, unter Leucin im 10-stündlichen Intervall bei 27.4 nmol/min und mg und im 5-Stunden-Abstand bei 30 nmol/min und mg.

Im Muskel steigt die Enzymaktivität pro mg Gesamt-KH-Gehalt unter Leucinfütterung im 10-Stunden-Intervall an, bei den nephrektomierten Tieren stärker von 27.2 auf 67.5 nmol pro min und mg KH-Gehalt. Die 5-stündlich gefütterten nephrektomierten Ratten liegen bei 29.5 nmol/min und mg im Mittel, die scheinoperierten fallen stark ab. Bis zu 5-fach höhere Enzymaktivitäten zeigen die Ratten unter Ketoleucinsubstitution, nach Ureterligatur liegen sie bei im Mittel 141 nmol/min und mg, die scheinoperierten Tiere sinken von 189 auf 71.7 nmol/min und mg.

Der Gehalt am aktiven Anteil der Glykogensynthetase, der Synthetase I, bezogen auf den Gesamtkohlenhydratgehalt, ist in Tabelle 24 dargestellt.

In der Leber verhält sich die spezifische Aktivität der Synthetase I ähnlich wie die Gesamtenzymaktivität. Die mit Leucin und Ketoleucin substituierten urämischen Tiere vermindern die Aktivität pro Gesamt-KH-Gehalt im untersuchten Zeitraum,unter proteinarmer Basisdiät dagegen nimmt die Synthetaseaktivität zu. Nach Scheinoperation liegt sie unter Leucinfütterung im 10-Stunden-Intervall bei ca. 10.4 nmol/min und mg Gesamt-KH-Gehalt, im 5-Stunden-Fütterungsintervall bei ca. 16.9 nmol/min und mg. Im Muskel zeigen die Ratten unter Ketoleucinfütterung bis zu 4-fach höhere Werte als die anderen Gruppen. Bei den scheinoperierten Gruppen verringert sich dabei die Synthetaseaktivität von 146 nach 20 Stunden auf 54 nmol/min und mg Gesamtkohlenhydratgehalt nach 60 Stunden. Ureterligiert liegt die Aktivität bei ca. 96 nmol/min und mg. Unter Leucinfütterung im 10-Stunden-Abstand steigen die spezifischen Aktivitäten nach Binephrektomie von 20.7 auf 34.0 nmol/min und mg an, bei 5-stündlichem Fütterungsintervall liegen sie im Mittel bei 24.2 nmol/min und mg.

Der prozentuale Anteil der Synthetase-I-Aktivität an der Aktivität der Gesamtsynthetase wird für Leber und Muskel in Tabelle 25 wiedergegeben. In der Leber zeigen die Tiere unter Leucinfütterung den höchsten Anteil aktiver Synthetase, bei 10-stündlichem Fütterungsintervall steigt der Anteil nach Binephrektomie von 55.1 auf 79.0 % im untersuchten Zeitraum, während er bei den scheinoperierten Tieren von 70.7 auf 51.2 % absinkt. Im 5-Stunden-Intervall bleibt der Synthetase-I-Anteil nach Binephrektomie im Mittel bei 72.1 %, nach Scheinoperation steigt er schnell an. Unter Ketoleucinsubstitution liegt der Anteil erheblich niedriger, nach Ureterligatur bei ca. 37.7 %, nach Scheinoperation bei ca. 35.2 %. Die Ratten unter proteinarmer Basisdiät liegen dazwischen, die urämischen Tiere bei im Mittel 60.7 %, die scheinoperierten bei ca. 47.0 %.
Im Muskel zeigt sich unter Ketoleucinfütterung der niedrigste Synthetase-I-Anteil mit im Mittel 68.9 % nach Ureterligatur und ca. 79.9 % nach Scheinoperation. Unter proteinarmer Basisdiät liegen die Werte im Mittel bei den scheinoperierten Tieren bei 76.3 % und bei den nephrektomierten bei 84.6 %. Leucin verschiebt den aktiven Anteil im 10-Stunden-Fütterungsintervall nach Scheinoperation von 62.2 nach 20 Stunden auf 74 % nach 60 Stunden, bei den binephrektomierten Ratten beträgt er im Mittel 76.4%.

Im 5-Stunden-Intervall nach Binephrektomie liegt der Anteil wesentlich höher, im Mittel bei 83.5 %, während er nach der Scheinoperation rasch absinkt.

Die Glykogensynthetaseaktivität von Leber und Muskel
(nmol Glucose/min und mg Protein)

Der Gesamtenzymgehalt

Tab. 19

Leber

	Fütterungs-intervall		20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	1.32	2.40	1.66
	BN	10	0.78	1.72	0.99
+ KIC	SOP	10	1.03 ± 0.1	2.16 ± 0.3	0.69 ± 0.2
	BN	10	0.82 ± 0.2	0.34 ± 0.1	-
	UL	10	0.88 ± 0.2	0.46 ± 0.2	0.49 ± 0.1
+ LEU	SOP	10	0.25 ± 0.1	0.62 ± 0.3	0.84 ± 0.2
	BN	10	0.78 ± 0.2	0.85 ± 0.2	1.28 ± 0.3
	SOP	5	0.98 ± 0.1	0.94 ± 0.2	0.69 ± 0.3
	BN	5	0.43 ± 0.2	0.51 ± 0.2	0.68 ± 0.2

Tab. 20

Muskel

MLPD	SOP	10	7.62	4.63	6.13
	BN	10	6.64	4.66	1.12
+ KIC	SOP	10	4.58 ± 1.1	4.78 ± 1.8	4.33 ± 1.0
	BN	10	2.73 ± 0.3	4.41 ± 1.8	-
	UL	10	6.87 ± 1.0	2.53 ± 0.9	3.06 ± 1.0
+ LEU	SOP	10	1.45 ± 0.4	2.92 ± 1.1	6.20 ± 1.4
	BN	10	2.49 ± 0.6	3.11 ± 1.2	3.91 ± 1.2
	SOP	5	3.17 ± 0.6	1.44 ± 0.5	1.55 ± 0.9
	BN	5	2.94 ± 0.7	3.50 ± 0.2	3.01 ± 1.1

Der Gehalt an aktiver Synthetase I
(nmol Glucose/min und mg Protein)

Tab. 21
Leber

	Fütterungs-intervall		20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	0.66	0.86	0.92
	BN	10	0.52	0.80	0.68
+ KIC	SOP	10	0.32 ± 0.1	0.79 ± 0.1	0.26 ± 0.1
	BN	10	0.35 ± 0.2	0.17 ± 0.1	-
	UL	10	0.31 ± 0.1	0.16 ± 0.1	0.21 ± 0.0
+ LEU	SOP	10	0.18 ± 0.1	0.38 ± 0.2	0.43 ± 0.1
	BN	10	0.43 ± 0.1	0.49 ± 0.2	1.01 ± 0.2
	SOP	5	0.34 ± 0.1	0.58 ± 0.1	0.56 ± 0.3
	BN	5	0.29 ± 0.1	0.46 ± 0.2	0.40 ± 0.1

Tab. 22
Muskel

MLPD	SOP	10	6.36	3.35	4.48
	BN	10	5.54	4.25	0.94
+ KIC	SOP	10	3.53 ± 0.9	4.17 ± 1.4	3.26 ± 0.8
	BN	10	1.67 ± 0.3	3.32 ± 1.4	-
	UL	10	4.89 ± 0.7	1.82 ± 0.7	1.95 ± 0.4
+ LEU	SOP	10	0.90 ± 0.1	2.08 ± 0.8	4.59 ± 0.8
	BN	10	1.89 ± 0.7	2.29 ± 1.8	3.12 ± 1.1
	SOP	5	2.95 ± 0.5	1.25 ± 0.6	0.90 ± 0.7
	BN	5	2.42 ± 0.6	2.95 ± 0.2	2.40 ± 1.0

Der Glykogensynthetase - Gesamtkohlenhydrat - Quotient
(nmol Glucose /min und mg Gesamtkohlenhydratgehalt)

Tab. 23

	Fütterungs-	intervall	Leber, nach 20 h	40 h	60 h	Muskel, nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	23.0	39.0	22.0	-	-	22.9
	BN	10	10.7	40.2	70.2	-	-	11.5
+ KIC	SOP	10	31.3	64.1	9.5	189	81.4	71.7
	BN	10	71.3	15.0		190	20.0	-
	UL	10	110	21.0	18.8	149	105	168
+ LEU	SOP	10	14.0	19.0	19.2	30.2	27.0	43.1
	BN	10	45.6	32.7	18.7	27.2	33.4	67.5
	SOP	5	32.9	35.3	22.0	54.9	38.4	27.8
	BN	5	20.4	14.0	8.1	25.8	32.4	30.2

Der Gehalt an aktiver Synthetase I

Tab. 24

	Fütterungs-	intervall	Leber, nach 20 h	40 h	60 h	Muskel, nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	11.0	14.0	12.0	-	-	16.7
	BN	10	7.1	18.7	48.2	-	-	9.7
+ KIC	SOP	10	9.7	23.4	3.6	146	71.0	54.0
	BN	10	30.4	7.5	-	117	15.1	-
	UL	10	38.8	7.3	8.1	106	75.2	107
+ LEU	SOP	10	9.8	11.7	9.8	18.8	19.3	31.9
	BN	10	25.1	18.8	14.7	20.7	24.6	34.0
	SOP	5	11.4	21.8	17.9	51.1	33.3	16.2
	BN	5	13.7	12.6	4.8	21.2	27.3	24.1

Der Anteil der aktiven Synthetase am Gesamtsynthetasegehalt in Prozent

Tab. 25

	Fütterungs-intervall		Leber, nach 20 h	40 h	60 h	Muskel, nach 20 h	40 h	60 h
MLPD	SOP	10	50.0	35.8	55.2	83.5	72.4	73.1
	BN	10	66.7	46.5	69.0	83.4	86.7	83.8
+ KIC	SOP	10	31.1	36.5	38.1	77.0	87.2	75.5
	BN	10	43.2	50.9		61.1	75.3	
	UL	10	35.0	35.2	42.9	71.2	71.8	63.7
+ LEU	SOP	10	70.7	57.6	51.2	62.2	71.2	74.0
	BN	10	55.1	57.6	79.0	75.9	73.6	79.8
	SOP	5	55.1	62.3	80.8	93.1	86.7	64.8
	BN	5	67.4	90.0	58.9	82.4	84.3	83.7

3.7 Überlebenszeiten der Tiere unter verschiedenen Substitutionsbedingungen

Die Überlebenszeit von binephrektomierten Ratten ist unter der Applikation hoher Dosen Ketoleucin bei den gewählten Bedingungen auf ca. 45 Stunden begrenzt. Scheinoperierte und ureterligierte Tiere leben nach Ketoleucingabe in der verwendeten Dosis nach 60 Stunden zu 100 %.
Ebenso überleben alle Tiere im untersuchten Zeitraum mit proteinarmer Basisdiät allein und in Kombination mit hohen Leucindosen. Die urämischen Tiere erreichen dabei bei Leucingabe eine Lebensdauer von 85 - 90 Stunden, während sie bei proteinarmer Basisdiät allein 70 Stunden nicht überschreiten.

4. Diskussion

An den Modellen der binephrektomierten, ureterligierten und scheinoperierten Ratte wurde der Effekt einer hochkalorischen (40 kcal/kg/24 h) und proteinarmen (0,12 g/kg) Kost in Kombination mit hohen Dosen von Leucin (0,6 g/Ratte/20 h) bzw. Ketoleucin (ebenso) auf den Protein- und Glykogenstoffwechsel der Leber und des Skeletmuskels untersucht.

Während ca. 200 g schwere Wistar-Ratten nach Scheinoperation und bilateraler Nephrektomie die Substitution einer proteinarmen Diät allein und in Kombination hoher Leucindosen ohne Toxicitätszeichen tolerierten, starben nahezu alle mit Ketoleucin behandelten binephrektomierten Ratten um die 45. Stunde. Nach Ureterligatur beträgt die Überlebensrate unter Ketoleucinverfütterung 100 % nach 60 Stunden. Offensichtlich bedarf der urämische Organismus zur Verstoffwechslung von Ketoleucin der Niere. Beachtet man die Aktivität des Leucinstoffwechsels in verschiedenen Organen gemessen an der Acetoacetatbildung aus Leucin, so wird deutlich, daß die Nieren mit 1300 nMol/Acetacetat/h/g Feuchtgewicht neben der laktierenden Mamma (1469 nMol/h/g), die bei weitem höchsten Stoffwechselaktivitäten aufweisen. Deutlich geringere Stoffwechselaktivitäten sind in der Leber (250 nMol/h/g), im Skeletmuskel (50 nMol/h/g) und im Myokard (40 nMol/h/g) mitgeteilt (77). Die Transaminierung von Leucin zu α-Ketoisocapronat (Ketoleucin) mit Bildung von Glutamat geschieht mit Hilfe des α-Ketoglutarat. α-Ketoglutarat gilt neben Citrat als besonders bevorzugtes Substrat für die Gluconeogenese der Niere (78, 79). Nach Binephrektomie könnte nun ein Anstieg von α-Ketoglutarat im Blut oder verschiedenen Organen die Umwandlung von Ketoleucin zu Leucin inhibieren. Dies könnte zu einer toxischen Akkumulation von Ketoleucin im Organismus führen und so die Letalität von hohen Ketoleucindosen nach Binephrektomie bei Ratten erklären.

Nach raschem Infundieren von Acetoacetat blieb jedoch die Blutkonzentration von α-Ketoglutarat bei scheinoperierten und nephrektomierten Ratten im Normbereich (80). Nach Binephrektomie wird offensichtlich weniger Ketoleucin zu Leucin umgewandelt, wobei sich das erheblich toxischere Ketoleucin im Organismus akkumuliert. Nun besitzt die Niere,nicht die

Leber die größte Aktivität an Aminotransferase, die die Umwandlung von Ketoleucin in Leucin in Gegenwart von Glutamat katalysiert (59, 81, 82). In dieser Situation kann die Toxicität des α-Ketoglutarats vernachlässigt werden. Nach Ureterligatur scheint die gluconeogenetische Aktivität der Niere für α-Ketoglutarat unverändert zu bestehen. Dann dürfte auch die Umwandlung von Ketoleucin in Leucin möglich sein, zumal die Überlebenszeit der Ratten nach Ureterligatur deutlich ansteigt.

Nach Binephrektomie liegt der Harnstoff-N bei den mit Leucin ernährten Tieren deutlich am höchsten. Dadurch wird die Bedeutung der exogen zugeführten Aminosäuren als zusätzliche Stickstoffquelle im urämischen Organismus unterstrichen. Unter Ketoleucinsubstitution liegen 60 Stunden nach Ureterligatur die Harnstoff-N-Werte in der gleichen Größenordnung wie bei den Tieren mit proteinarmer Basisdiät. Auffällig ist, daß Leucin im 5-Stunden-Intervall verfüttert, 60 Stunden nach Binephrektomie, zu einem wesentlich geringeren Harnstoff-N-Anstieg führt (473 ± 42 mg %) im Vergleich zu den im 10-Stunden-Intervall gefütterten Tieren unter Leucinsubstitution (BUN = 662 ± 41 mg %). Längere Fütterungsintervalle scheinen den urämischen Katabolismus zu begünstigen. Möglicherweise werden während dieses verlängerten Zeitintervalls verstärkt körpereigene Reserven abgebaut, während bei kontinuierlicher Energiezufuhr körpereigene Substrate in geringeren Maße verstoffwechsel werden.

Eine auffällige Diskrepanz des Blutzuckers besteht bei scheinoperierten und bei binephrektomierten Ratten, die mit Leucin im 5-Stunden und im 10-Stunden-Intervall gefüttert wurden. Bei den scheinoperierten Ratten führt Leucin eher zu hypoglykämischen Werten, während die Blutzuckerwerte bei den nephrektomierten Ratten deutlich höher liegen. Dabei steigt der Blutzucker 60 Stunden nach Binephrektomie unter 5-stündiger Leucinverfütterung auf 155 ± 18 mg %. Leichte Hypoglykämien nach Leucingabe bei kurzzeitigem Hunger sind aus der Literatur bekannt (52, 83). Für die Leucin-induzierte Hyperglykämie beim akut urämischen Organismus bieten sich mehrere Erklärungen an: In katabolen, mit Streß einhergehenden Zuständen nimmt die periphere Glukoseaufnahme zugunsten einer verstärkten Leucinoxydation ab (60). Exogen zugeführtes Leucin sollte diesen Prozeß

verstärken. Zugleich werden Alaninproduktion des Muskels und die Glukoneogenese aus Alanin gesteigert (31, 44, 45, 46, 50, 52). Die verminderte Insulinwirkung bzw. Insulinresistenz bei akuter Urämie kann offensichtlich zusätzliche Glukagon- und Katecholamineffekte nicht mehr antagonisieren. Die gemeinsame Folge ist eine Hyperglykämie. Während unter Ketoleucingabe die Blutzuckerwerte bei scheinoperierten und binephrektomierten Ratten zwischen 79 und 108 mg % liegen, haben wir 60 Stunden nach Ureterligatur relativ niedrige Blutzuckerwerte ermittelt (79 ± 6 mg %). Ketoleucin soll bei der Ahornsirupkrankheit die interkurrenten hypoglykämischen Anfälle verursachen (62). Es wird dort im Stoffwechsel angehäuft. Bei den akut urämischen Tieren dürfte die Ketoleucin-induzierte Erniedrigung der Blutzuckerwerte auf eine im Endstadium der akuten Urämie ungenügende Transaminierung zu Leucin hinweisen. Einige Arbeiten zeigen eine Hemmung von Enzymen des Glukosestoffwechsels durch Ketoisokapronsäure (=Ketoleucin): Pyruvatdecarboxylase und alpha-Ketoglutaratdecarboxylase werden völlig inaktiviert (69, 70, 84, 85). Die Folge ist einmal, daß kein Pyruvat mehr in den Zitronensäurezyklus eingeschleust werden kann, zum andern wird der Abbau von Fettsäuren über Acetyl-CoA äußerst erschwert. Die dadurch verminderte Energieproduktion könnte über eine verstärkte Glykolyse ausgeglichen werden. Weiterhin wird ein Einfluß des Fettsäurestoffwechsels auf die Glukoneogenese über eine Aktivierung bzw. Hemmung der Pyruvatcarboxylase mit steigender bzw. fallender Acetyl-CoA-Konzentration postuliert (25, 86, 87). Beide Möglichkeiten könnten zu einer Erniedrigung des Blutzuckers führen. Weiter ist auch in der Niere die Glukoneogenese aus im Tubulus aus Pyruvat und Lactat in Gegenwart von alpha-Ketoisokapronsäure stark gehemmt (88).

In den ersten 40 Stunden nach Scheinoperation und nach Binephrektomie bleibt der Proteingehalt der Leber unter Verfütterung einer proteinarmen Basisdiät nahezu konstant. In beiden Gruppen erfolgt ein Anstieg bis zur 60. Stunde um 40 - 60 %. Dieser Anstieg des Leberproteingehalts, gerade beim urämischen Organismus, stimmt auch mit anderen Untersuchern überein (53, 54). Er wird auf eine vermehrte Proteolyse des Muskels und auf einen Aminosäuretransfer vom Muskel zur Leber zurückgeführt (61). Von Fröhlich et al. (37) wird auch ein normaler Leberproteingehalt in

der akuten Urämie berichtet. Bei den scheinoperierten Tieren dürfte nach dem Operationstrauma der Erholungsprozeß mit gesteigerter Proteinsnythese beginnen. Leucin erhöht den Leberproteingehalt im Vergleich zu den proteinarm ernährten Tieren während der ersten 40 Stunden nahezu um das Doppelte. In den 5-stündlich gefütterten Gruppen liegen die Werte noch etwas höher. Ursache könnte die regelmäßigere Energiezufuhr sein. Einige Untersucher berichten von verringerter Oxydation der verzweigtkettigen Aminosäuren bei Ratten, die mit einer proteinarmen Diät gefüttert wurden (89, 90, 91). Proteinanabole Wirkungen wurden bislang nur für den Skeletmuskel beschrieben (92). Unsere Untersuchungen zeigen bei hoher Leucindosierung eindeutig proteinanabole Wirkungen auch in der Leber. Ketoleucin bewirkt ebenfalls einen deutlichen Anstieg des Leberproteins, wenngleich die Werte unter den bei Leucin erhobenen Befunden liegen. Möglicherweise führt die verstärkte hepatische Glukoneogenese mit vermehrter Aufnahme von Aminosäuren in die Leber bei akuter Urämie zu dem beobachteten Leberproteinanstieg (31, 50). Die verzweigtkettigen Aminosäuren Leucin, Isoleucin und Valin werden vorwiegend extrahepatisch oxidiert (51, 93, 94, 95). In Hepatomazellkulturen gelang jedoch mit zunehmender Konzentration von Leucin im Medium eine Stimulierung der Enzymsynthese und eine Hemmung des Enyzmabbaus (96). Im perfundierten Herzen ist die Proteinsynthese nach Applikation eines gegenüber physiologischen Konzentrationen fünffach erhöhten Gemisches an essentiellen Aminosäuren beschleunigt (97). Die Stimulierung der Proteinsynthese ist vergleichbar, wenn nur die Konzentration der verzweigtkettigen Aminosäuren erhöht wird (58). An isolierten Rattenherzen läßt sich darüber hinaus die Proteinsynthese durch Palmitat und Acetat stimulieren, ein Effekt, der auf eine intrazelluläre Erhöhung von Leucin zurückgeführt wird (49, 99). Chawla und seine Mitarbeiter konnten zeigen, daß bei Applikation von α-Ketoisovaleriansäure im Vergleich zu Valin die Effizienz der Umwandlung mit der Konzentration der Aufnahme abnimmt. So liegt die Effizienz der Utilisation der α-Ketoanaloge bei 80 % bei niedriger Zufuhr unter 40 % bei hoher Zufuhr (14, 98). In Übereinstimmung damit finden wir bei Zufuhr hoher Dosen Leucin deutlich günstigere Effekte als nach Gabe hoher Ketoleucindosen.

Der Proteingehalt des Muskels liegt bei scheinoperierten und binephrektomierten Ratten unter Substitution mit einer hochkalorischen proteinarmen

Diät zwischen 15 und 20 mg/ml Rohextrakt. In den mit Leucin bzw. Ketoleucin gefütterten Gruppen ergeben sich folgende interessante Aspekte: Die 10-stündlich gefütterten scheinoperierten Tiere verlieren in beiden Gruppen kontinuierlich an Protein. Die 5-stündlich gefütterten scheinoperierten Leucintiere dagegen und sämtliche urämische Leucintiere halten den Muskelproteingehalt im gesamten untersuchten Zeitraum konstant. Wiederum liegen die Muskelproteinwerte für die 5-stündlich gefütterten Tiere höher als bei den 10-stündlich gefütterten Ratten. Nach Ureterligatur können wir bei Ketoleucinverfütterung sogar einen kontinuierlichen Anstieg des Muskelproteins beobachten. Unsere Ergebnisse bestätigen den proteinanabolen Einfluß von Leucin. Offensichtlich kann Leucin, unter urämischen Bedingungen in hohen Konzentrationen angeboten, den Proteinabbau stoppen oder gar nicht in Gang kommen lassen. Seine gegenüber anderen Aminosäuren bevorzugte Verstoffwechslung im Muskel kann teilweise Lebersubstrate einsparen. Zusammen mit einer erhöhten Alaninproduktion in der Urämie, die möglicherweise durch Leucin weiter gesteigert wird und der dadurch verstärkten Glukoneogenese, ist die bevorzugte Leucinoxidation ein wichtiger Grund für die bei mit Leucin gefütterten urämischen Tieren beobachtete Hyperglykämie (31, 45, 46, 47, 55). Ketoleucin scheint, obwohl schwächer ausgeprägt, vergleichbare Wirkungen wie Leucin zu besitzen. Möglicherweise ist die Effizienz von Ketoleucin durch die Geschwindigkeit der Transaminierung limitiert (14, 57). Darüber hinaus zeigt sich auch am Muskelprotein die verminderte Utilisation von Ketoleucin bei Applikation hoher Dosen im Vergleich zu Leucin. Die Leucinoxidation im Muskel erfolgt unter hormoneller Kontrolle von Insulin, Wachstumshormon, Katecholaminen und Cortisol (60, 99). Nach hämorraghischem Schock ist die Leucinoxidation ebenso erhöht wie im Hungerzustand oder bei Diabetes mellitus (44, 51, 66, 99). Dabei scheint Leucin der Regulator des Protein-Turnovers im Muskel zu sein (47). Weiter scheinen bei früheren Untersuchungen hohe Dosen von Leucin größere Effekte auf die Proteinsynthese auszuüben als durch physiologische Konzentrationen erreichbar ist (58, 97).

Bei den 10-stündlich scheinoperierten Tieren liegt der Leberglykogengehalt nach Fütterung einer proteinarmen Basisdiät allein etwa in der Größenordnung der unter Leucinfütterung bestimmten Glykogenwerte. Nie-

drigere Glykogenwerte haben wir unter Ketoleucinverfütterung bei scheinoperierten Ratten gemessen. Bei den binephrektomierten Ratten liegen wiederum die Tiere mit Basisdiät und Leucinfütterung in der gleichen Größenordnung, ebenso liegen die Leberglykogenwerte unter Ketoleucinverfütterung am niedrigsten. Insgesamt befinden sich die beim akut urämischen Tier bestimmten Leberglykogenwerte signifikant unter den beim scheinoperierten Tier gewonnenen Daten und in allen Gruppen erheblich unter den Glykogenkonzentrationen unbehandelter Kontrollen. Selbst beim scheinoperierten Tier gelingt es offensichtlich nicht, über eine leucininduzierte Insulinfreisetzung den katabolen Operationsstreß zu neutralisieren. Die Verfütterung von Leucin im 5-Stunden-Intervall läßt im Vergleich zu 10-stündlicher Applikation von Leucin die Leberglykogenwerte ca. um den Faktor 2-3 ansteigen. Auffällig ist ein nahezu 10-facher Anstieg des Leberglykogens von der 20. bis zur 60. Stunde nach Binephrektomie unter 5-stündiger Leucinverfütterung. Im Gegensatz dazu inhibieren hohe Leucinkonzentrationen den Einbau von C_3-Bauteilen in Glukose und Glykogen bei der Mäuseleber, was auf eine direkte Wirkung von Leucin auf die hepatische Glukoneogenese hinweist (100). Leucin hemmt offensichtlich die Glykogenolyse in der Leber, während Ketoleucin in der akuten Urämie eine glykogenolytische Wirkung hat. Wird das Leberglykogen als Quotient zum Leberprotein angegeben, so erhöhen sich die unter einer gemischten proteinarmen Basisdiät errechneten Quotienten im Vergleich zu den durch Leucin und noch mehr zu den unter Ketoleucinverfütterung gewonnenen Leberglykogenwerten. Es wird deutlich, daß sich die hauptsächliche Wirkung von Leucin auf den Proteinstoffwechsel erstreckt und weniger auf den Glykogenstoffwechsel.

Bei Betrachtung der Muskelglykogenwerte ergeben sich bei scheinoperierten, ureterligierten und binephrektomierten Ratten unter Leucin, Ketoleucin und Basisdiätsubstitution im 10-Stunden-Intervall keine sicheren Unterschiede. Ca.10-fach höhere Werte haben wir bei scheinoperierten Tieren nach 5-stündlicher Leucinfütterung gemessen. Im Gegensatz dazu liegen die nach 5-stündlicher Leucinapplikation an binephrektomierten Ratten gewonnenen Leberglykogenwerte in der Größenordnung der 10-stündlich gefütterten Tiere. Offensichtlich lassen sich also Effekte von Leucin auf die Muskelglykogensynthese nur beim scheinoperierten Tier in hoher Kon-

zentration und kurzem Fütterungsintervall nachweisen, möglicherweise über eine leucininduzierte Insulinfreisetzung (83), deren Wirkung beim urämischen Tier wohl infolge der zunehmenden Insulinresistenz ausbleibt (10). So liegen die Blutzuckerspiegel der urämischen Tiere erheblich über denen der scheinoperierten Ratten.

Mit der Messung der gesamten Kohlenhydrate, außer Glykogen auch Glukose und intermediäre Stoffwechselprodukte, kann Umsatz und Größe des Kohlenhydratstoffwechsels beurteilt werden. Der Leberkohlenhydratstoffwechsel läßt bei scheinoperierten Tieren keine wesentlichen Unterschiede unter den verschiedenen Substitutionsbedingungen erkennen. Bei den urämischen Ratten verhalten sich proteinarme Basisdiät und Ketoleucin ähnlich, Leucinverfütterung ruft dagegen einen raschen Anstieg des Kohlenhydratumsatzes hervor, wobei er bei den 5-stündlich gefütterten Tieren am höchsten steigt. Leucinsubstitution in hohen Dosen vertärkt offensichtlich die Gluconeogenese der urämischen Leber aus Aminosäuren. Dies könnte über einen vermehrten Einstrom von Alanin aus dem Alaninzyklus in die Leber geschehen. Nach anderen Untersuchungen hat erhöhte Leucinzufuhr eine vermehrte Oxidation im Muskel zur Folge und damit einen vermehrten Anfall von Alanin für die Leber (22, 31, 37, 42). Die verstärkte Gluconeogenese führt allerdings nicht auch zu einem gleich großen Anstieg der Glykogensynthese in der urämischen Leber. Bezogen auf Leberprotein, werden die unterschiedlichen Verläufe des Kohlenhydratumsatzes noch deutlicher ausgedrückt.

Der Muskelkohlenhydratumsatz, der im wesentlichen den Glykogenstoffwechsel im Muskel wiederspiegelt, läßt unter Leucinsubstitution bei scheinoperierten und binephrektomierten Tieren keine signifikanten Unterschiede erkennen. Auch hohe Leucindosen scheinen den Kohlenhydratumsatz im Muskel während des untersuchten Zeitraums wenig zu beeinflussen. Ketoleucinverfütterung dagegen zeigt sich durch sehr niedrige Kohlenhydratwerte, was wieder auf die schon vorher beobachtete Hemmung des Kohlenhydratstoffwechsels durch Ketoleucin hinweist.

Die von uns gemessenen Enyzmaktivitäten der Phosphorylase, dem glykogenspaltenden Enzym, korrelieren gut mit den entsprechenden Glykogenwerten in der Leber. Eine niedrige Phosphorylase-a-Aktivität, dem aktiven Enzym-

anteil, wird von erhöhten Glykogenkonzentrationen begleitet, mit zunehmender Phosphorylase-a-Aktivität nimmt die Leberglykogenkonzentration ab. Leucin hemmt offensichtlich in der Leber die Glykogenolyse, während Ketoleucin nach unseren Untersuchungen einen deutlich glykogenolytischen Effekt bei akuter Urämie aufweist. Möglicherweise induziert die durch Leucin vermittelte Insulinfreisetzung eine Abschwächung der glykogenolytischen Wirkung der Insulinantagonisten Glukagon und Adrenalin durch Stimulierung der Glykogensynthese.

Werden nun die von Phosphorylase a umgesetzten Einheiten Phosphat/min nicht auf das Leberprotein, sondern auf den Gesamtkohlenhydratgehalt der Leber bezogen, so ergeben sich folgende interessante Aspekte: Bleibt unter Leucinverfütterung der bei scheinoperierten Ratten der errechnete Wert über den beobachteten Zeitraum konstant (um 2.4 nmol/min und mg KH) so kommt es bei den vergleichbaren binephrektomierten Tieren zu einem Abfall des Quotienten von 4,1 auf 1,0 nmol/min und mg KH, unter 10-stündigen Fütterungsintervallen. Ureterligierte, 10-stündlich mit Ketoleucin gefütterte Tiere zeigen nach 20 Stunden einen Quotienten von 22,5 (binephrektomiert 18,5). Dieser Wert verringert sich bis zur 60. Stunde nach Ureterligatur auf 5 nmol/min und KH. Im 5-Stunden-Intervall gefütterte Tiere (scheinoperiert, Leucin) liegen mit ihrem Phosphorylase/KH-Quotienten konstant bei 1,5 nmol/min und mg KH. Im Gegensatz dazu fällt wiederum bei binephrektomierten Ratten der errechnete Wert von 4,0 auf 0,5 nmol/min und mg KH.

Auch im Muskel korrelieren die Phosphorylaseaktivitäten gut mit den erhobenen Glykogenkonzentrationen. Der deutlich erhöhten Muskelphosphorylaseaktivität, vergleichbar der Leber, entsprechend ebenso deutlich verminderte Glykogenkonzentrationen im Muskel. Wiederum lassen sich durch Ketoleucin hohe glykogenolytische Aktivitäten im Muskel erreichen. Errechnet man ebenfalls die von der Phosphorylase a umgesetzten nmole Phosphat/min auf den Gesamtkohlenhydratgehalt des Muskels an, so werden die Unterschiede zwischen Leucin und Ketoleucin auf die Glykogenolyse noch eindrucksvoller: Kommt es bei scheinoperierten Ratten zu einem Rückgang des Quotienten von 15 auf 5 innerhalb des beobachteten Zeitraums, so liegen die Vergleichswerte nach Ketoleucinapplikation zwischen

50 und 60 nmol/min und mg KH. 10-fach höher liegen die errechneten Quotienten bei ureterligierten, ketoleucingefütterten Ratten im Vergleich zu leucingefütterten binephrektomierten Tieren. Die 5-stündige Verfütterung von Leucin läßt sowohl bei scheinoperierten wie auch bei binephrektomierten Ratten den Phosphorylase/KH-Quotienten deutlich abfallen (bei scheinoperierten Tieren liegen die Werte konstant um 1,0 bei binephrektomierten konstant um 2,0 nmol/min und mg KH). Auch im Muskel läßt sich bei Verfütterung von Leucin in hohen Dosen eine eindeutige glykogenolysehemmende Wirkung erzielen. Dem akut urämischen Organismus gelingt es dagegen nicht, auch nicht nach Ureterligatur, Ketoleucin als anaboles Substrat hinsichtlich des Kohlenhydratstoffwechsels zu mobilisieren.

Die von uns ermittelten spezifischen Aktivitäten für die Glykogensynthetase passen gut zu den gemessenen Phosphorylaseaktivitäten: Mit Erhöhung der Phosphorylaseaktivität kommt es bei akuter Urämie und scheinoperierten Kontrollen zu einer zunehmenden Inaktivierung der Glykogensynthetase sowohl in der Gesamtaktivität des Enzyms, als auch im relativen Anteil der aktiven I-Form der Muskel- und Leberglykogensynthetase. Betrachtet man den prozentualen Anteil der aktiven I-Form an der Gesamtaktivität des Enzyms, so wird deutlich, daß wiederum Leucin am besten als Stimulator der Glykogensynthetase fungiert: Bei scheinoperierten Ratten, im 10-Stunden-Intervall gefüttert, ergibt sich in der Leber ein prozentualer Anteil zwischen 51 und 70 % I-Form, bei Basisdiättieren von 36 - 55 % aktive I-Form und nach Ketoleucingabe von 31 % bis 38 % aktive I-Form. Nach Nephrektomie erhöht sich der aktive Anteil des Enzyms: Bei Leucinverfütterung zwischen 43 und 51 %. Ureterligierte, ketoleucinsubstituierte Tiere weisen einen aktiven Anteil von 35 - 43 % im Vergleich zur Gesamtaktivität der Glykogensynthetase der Leber auf. Im 5-Stunden-Intervall leucinsubstituierte, scheinoperierte Tiere zeigen einen aktiven Enzymanteil von 55 bis 81 %, dieser Aktivierungsanteil erhöht sich nach Binephrektomie bei 5-stündlicher Fütterung mit Leucin auf Werte zwischen 59 und 90 %. Leucin zeigt eine anabole Wirkung auch auf Glykogenstoffwechsel, erreicht aber nicht die gleiche Effizienz, die im Proteinstoffwechsel zu bemerken war. Ketoleucin vermag im urämischen Organismus Leucin nicht zu ersetzen.

Eine optimale Zusammensetzung von Aminosäuren zur Substitution von Patienten mit akutem Nierenversagen ist bislang nicht gefunden. Am Modell der nephrektomierten bzw. ureterligierten Ratte ist von uns jedoch in der vorliegenden Studie gezeigt worden, daß auf die Gabe von Leucin wegen der Vielzahl der anabolen Effekte nicht verzichtet werden kann. Wir halten eine möglichst hohe Dosierung von Leucin bei akutem Nierenversagen für sinnvoll und würden bei dieser hohen Dosierung der Aminosäure im Vergleich zu α-Ketoisocapronsäure (Ketoleucin) den Vorzug geben.

5. Zusammenfassung

Unter hochdosierter Gabe von Ketoleucin (0.6 g/Ratte/20 h) starben alle binephrektomierten Ratten noch vor Erreichen der 45. Stunde. Dagegen überlebten alle Tiere nach Ureterligatur die 60-Stunden-Grenze. Im Vergleich zu den nur mit proteinarmer Basisdiät gefütterten Tieren verdoppelte sich der Leber- und Muskelproteingehalt unter Leucinverfütterung nahezu, während der Leberproteingehalt bei Ketoleucinverfütterung in den ersten 40 Stunden nach Operation um das einundhalbfache anstieg. Bei ureterligierten Ratten mit Ketoleucinsubstitution vergrößerte sich der Muskelproteingehalt ebenfalls. Bei den im 5-Stunden-Intervall gefütterten binephrektomierten Tieren stiegen unter Leucinsubstitution Glykogen- und Gesamtkohlenhydratgehalt der Leber zwischen der 20. und 60. Stunde um den 10-fachen Betrag an. Im akut urämischen Skeletmuskel konnten bei 10-stündigem Fütterungsintervall keine signifikanten Unterschiede zwischen Leucin, Ketoleucin und proteinarmer Basisdiät gesehen werden. Leucin hemmt offensichtlich die Glykogenolyse durch Verminderung der Phosphorylase-a-Aktivität in Leber und Muskel, wogegen Ketoleucin eindeutig glykogenolytische Wirkungen in der akuten Urämie besitzt. Gleichzeitig mit ansteigenden Phosphorylase-a-Aktivitäten wird die Synthetase-I, der aktive Anteil der Glykogensynthetase unter Ketoleucinsubstitution zunehmend inaktiviert. Unter Leucinapplikation im 5-stündlichen Abstand steigt die Lebersynthetase I 20 Stunden nach Binephrektomie auf einen Maximalwert von 90 % der Gesamtenzymaktivität.

Literaturverzeichnis

1 KRAMER, H.J.; KRÜCK, F.: Experimentelle Befunde zur Pathogenese der urämischen Intoxikation unter besonderer Berücksichtigung des zellulären Elektrolyttransports. In 5. Symposium Aktuelle Probleme der Dialyseverfahren und der Niereninsuffizienz, 1974. Herausgeber: P. von Dittrich, F. Shrbare und W.D. Stuhlinger, Verlag Carl Bindernagel, Friedberg/Hessen.

2 BALESTRI, P.L.; BIOGINI, M.; RIUDI, P.; GIOVANNETTI, S.: Uremic Toxins. Arch.Int.Med., 126, S. 843 (1970).

3 GIORDANA, C.; DESANTO, N.G. and SENATORE, R.: Effects of Catabolic Stress in Acute and Chronic Renal Failure. Am.J.Clin.Nutr., 31: 1561 (1978).

4 KOLFF, W.J.: Forced High-Caloric, Low Protein Diet and the Treatment of Uremia. Am.J.Med., 12:667 (1952).

5 HEIMSOTH, V.: Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel. In: Urämie, Aesopus-verlag, S. 77 (1977).

6 SARRE, H.: Nierenkrankheiten. Thieme-Verlag (1976).

7 BOUCOT, N.G.; GUILD, W.R. and MERRIL, J.P.: Carbohydrate in Rats with Acute Uremia. Am.J.Physiol. 192:30 (1958).

8 HARPER, LÖFFLER, WEISS, PETRIDES. Physiologische Chemie. Springer-Verlag (1975).

9 DUDRICH, S.J.; STEIGER, E. and LONG, J.M.: Renal Failure in Surgical Patients. Treatment with Intravenous Essential Aminoacids. Surg. 68:180 (1970).

10 DEFRONZO, R.A.; TOBIN, J.D.; ROWE, J.W. and ANDRES, R.: Glucose Intolerance in Uremia. J.Clin.Invest. 62:425 (1978).

11 COOK, D.B.: Gluconeogenesis in the Guinea Pig. Eur. J.Biochem. 76:567 (1977).

12 UI,M.; CLAUS, TH.H.; EXTON, J.H. and YORK, C.R.: Studies on the Mechanism of Action of Glucagon on Gluconeogenesis. J.Biol. Chem. 248:5344 (1973).

13 GÄNG, V. et al: Vitamin B_6-Mangel und Substitution bei chronischer Urämie. Klin.Wschr. 53:335 (1975).

14 CHAWLA, R.K.; STACKHOUSE, W.J. and WADSWORTH, A.D.: Efficiency of Ketoisocaproicacid as a Substitute for Leucine in the Diet of the Growing Rat. J.Nutr. 105:798 (1975).

15 SULLIVAN, T.W. and BIRD, H.R.: Effect of Quantity and Source of Dietary Nitrogen on the Utilization of the Hydroxy Analogues of Methionine and Glycine by Chicks. J.Nutr. 62:143 (1957).

16 ELSAS, L.J.; PASK, B.A.; WHEELER, F.B.; PER, D.P. and TRUSLER, S.: Classical Maple Syrup Urine Disease. Cofactor Resistance Metabolism 21:929 (1972).

17 LOWRY, N.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. and RANDALL, R.J.: Protein Measurements with the Folin Phenol. Reagents. J.Biol.Chem. 193:254 (1951).

18a REAVEN, G.M. and REAVEN, P.D.: Development of fasting hyperglycemia in Uremic Rats. Metabolism 26:1251 (1977).

18b RUTSKY, E.A.; MC DANIEL, H.G.; THARPE, D.L.; ALREAD, G. and PEK, S.: Spontaneous hypoglycemia in Chronic Renal Failure. Arch.Lit. Med. 138:1363 (1978).

19 THOMAS, I.A.; SCHLENDER, K.K. and LARNER, J.: A Rapid Filter Paper Assay for UPD-Glucose - Glycogen Glycosyltransferase, including an Improved Biosynthesis of UDP ^{14}C - Glucose. Anal.Biochem. 25:486 (1968).

20 STALMANS, W. and HERS, H.G.: The Stimulation of Liver Phosphorylase by CAMP, Fluoride and Sulfate. Eur.J.Biochem. 54:341 (1975).

21 HASCHKE, R.H. and HEILMEYER, L.M.G.Jr.: An Automatic Assay for Glycogenphosphorylase. Anal.Biochem. 47:451 (1972).

22 GARRISON, J.C. and HAYNES, R.C.Jr.: Hormonal Control of Glyconeolysis and Gluconeogenesis in Isolated Rat Liver Cells. J.Biol.Chem. 248:5333 (1973).

23 FELIG, P.: Amino Acid Metabolism in Man.Ann.Rev.Biochem. 44:933 (1975).

24 HÖRL, W.H.; SPERLIN, J. and HEIDLAND, A.: Enhanced Glycogen Turnover in Skeletal Muscle of Uremic Rats - Cause of Uncontrolled Actomyosin ATPase? J.Clin.Nutr. 31:1861 (1978).

25 EXTON, J.H.: Gluconeogenesis. Metabolism 21:945 (1972).

26 KEMP, B.E. and CLARK, M.G.: Adrenergic Controll of the Cyclic-AMP dependent Proteinkinase and Pyruvatkinase in Isolated Hepatocytes. J.Biol.Chem. 253:5147 (1978).

27 MADDAIAH, V.T. and MADSEN, N.B.: Studies on the Biological Control of Glycogen Metabolism in Liver. I. State and Activity Pattern of Glycogen Phosphorylase.Biochem. Biophys. Acta 121:261 (1966).

28 KILLILEA, S.D.; BRANDT, H.; LEE, E.Y.C. and WHELAN, W.J.: Evidence for the Coordinate Control of Activity of Liver Glycogen Synthase and Phosphorylase by a Single Protein Phosphatase. J.Biol.Chem. 251:2363 (1976).

28 COHEN, P.; ANTIONIW, J.F. and NIMMO, H.G.: Identification and role of two new regulatory enzymes in glycogen metabolism. 10th International Congress of Biochemiestry, p.366 (1976).

30 NIMMO, H.G.; PROUD, C.G. and COHEN, P.: The phosphorylation of rabbit skeletal muscle glycogen synthetase kinase-2 and adenosin-3:5' -monophosphate-dependet protein kinase. Eur.J.Biochem. 68:21 (1976).

31 FRÖHLICH, J.; SCHÖLMERISCH, J.; HOPPE-SEYLER, G.; MAIER, K.P.; TAKE, H.; SCHOLLMEYER, P. and GEROK, W.: The effect of acute uremia on gluconeogenesis in isolated perfused rat livers. Eur.J.Clin.Invest. 4:453 (1974).

32 BILBREY, G.L.; FALCONA, G.R.; WHITE, M.G. and KNOCHEL, J.P.: Hyperglucagonemia of renal failure. J.Clin.Invest. 53:841 (1974).

33 PERKOFF, G.T.; THOMAS, C.L.; NEWTON, J.D.; SELLMAN, J.C. and TYLER, F.H.: Mechanism of impaired glucose tolerance in uremia and experimental hyperazotemia. Diabetes 7:375 (1958).

34 MONDON, C.E.; DOLKAS, C.B.; REAVEN, G.M.: Effect of acute uremia on insulin removal of perfused rat liver and muscle. Metabolism 27:133 (1978).

35 WESTERVELT, F.B. and SCHREINER, G.E.: The carbohydrate intolerance of uremic patients. Ann.Intern. Med. 57:266 (1962).

36 WESTERVELT, F.B.: Abnormal carbohydrate metabolism in uremia. Am.J. Clin.Nutr. 21:423 (1968).

37 FRÖHLICH, J.; HOPPE-SEYLER, G.; SCHOLLMEYER, P.; MEYER, H.P. and GEROK, W.: Possible sites of interaction of renal failure with aminoacid utilization for gluconeogenesis in isolated perfused rat liver. Eur.J.Clin.Invest. 7:261 (1977).

38 DEFRONZO, R.A.; ANDRES, R.; EDGAR, P. and WALKER, W.C.: Carbohydrate metabolism in uremia: a review.Medicine 52:469 (1973).

39 SOMOM, V. and FELIG, P.: Altered glucagon and insulin binding to hepatic receptors. Cellular mechanism of glucose intolerance in uremia. Clin.Res. 25:401 A (1977).

40 EMERSON, P.M.; WITHCOMBIE, W.A. and WILKINSON, J.H.: Inhibition of lactat-dehydrogenase by sera of uremic patients. Lancet 2:571 (1965).

41 EXTON, J.H. and PARK, C.R.: Control of gluconeogenesis in liver. J.Biol.Chem. 242:2622 (1967).

42 FELIG, P.; MARLISS, E.; POZEFSKY, T. and CAHILL jr.ALANINE G.F.: Key role in gluconeogenesis. Science 107:1003 (1970).

43 CHOCHINOR, R.H.; PERLMAN, K. and MOORHOUSE, J.H.: Circulating alanine production and disposition in healthy subjects. Diabetes 27:287 (1978).

44 ODESSEY, R.; KHAIRALLAH, E.A. and GOLDBERG, A.L.: Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. J.Biol. Chem. 259:7623 (1974).

45 GARBER, A.J.: Skeletal muscle protein and aminoacid metabolism in experimental chronic uremia in the rat. J.Clin.Invest. 62:623 (1978).

46 GARBER, A.J.: The regulation of skeletal muscle alanine and glutamine formation and release in experimental chronic uremia in the rat. J.Clin.Invest. 62:633 (1978).

47 BUSE, M.G. and REID, S.: Leucine: A possible regulator of protein in muscle. J.Clin.Invest. 56:1250 (1975).

48 ODESSEY, R. and GOLDBERG, A.C.: Oxidation of leucine by rat muscle. Am.J.Physiol. 223:1376 (1972).

49 BUSE, M.G.; BIGGERS, J.E.; FRIDERICI, K.H. and BUSE, J.F.: Oxidation of branched-chain aminoacids by isolated hearts and diaphragm of the rat. The effect of fatty acids, glucose and pyruvate regulation. J.Biol.Chem. 247:8085 (1972).

50 LACY, W.W.: Uptake of individual aminoacids by perfused rat liver-effect of acute uremia. Am.J.Physiol. 219:649 (1970).

51 GOLDBERG, A.C. and ODESSEY, R.: Oxidation of aminoacids by diaphragm of fed and fastened rats. Am.J.Physiol. 223:1384 (1972).

52 SHERWIN, R.S.: Effect of starvation on turnover and metabolic response of leucine. J.Clin.Invest. 61:1471 (1978).

53 SHEAR, L.: Internal redistributation of tissue protein synthesis in uremia. J.Clin.Invest. 48:1252 (1969).

54 MC CORMICK, G.J.; SHEAR, L. and BARRY, K.G.: Alteration of hepatic protein synthesis in acute uremia. Proc. Soc. Exp. Biol.Med. 122:99 (1966).

55 SHERWIN, R. and FELIG, P.: Glucose and nitrogen sparing effects of exogenous leucine and decreased endogenous leucine in starvation. Clin.Res. 25:400A (1977).

56 SHERWIN, R.; FISHER, M.; BASTL, C.; HENDER, R.; BLACK, H.; FINKELSTEIN, F. and FELIG, P.: Decreased glucagon turnover: mechanism of hypergluconemia and glucose intolerance in uremia. Clin. Res. 23:332 A (1975).

57 CHAN, W. and WALSER, M.: Effect of branched-chain ketoacids and dietary protein content on the activity of branched-chain aminoacid transferase in rat tissues. J.Nutr. 108:40 (1978).

58 LUNDHOLM, K. and SCHERTEN, T.: Protein synthesis in human skeletal muscle tissue: influence of insulin and aminoacids. Eur.J. Clin.Invest. 7:531 (1977).

59 ADIBI, S.A.; PETERSON, J.A. and KRYSZIK, B.A.: Modulation of leucin transaminase activity by dietary means. Am.J.Physiol. 228:432 (1975).

60 RYAN, N.T.; GEORGE, B.C.; ODESSEY, R. and EGDAHL, R.U.: Effect of hemmorrhagic shock, fasting and corticosterone administration on leucine oxidation and incorporation into protein by skeletal muscle. Metabolism 32:901 (1974).

61 ADIBI, S.A.: Metabolism of branched-chain aminoacids in altered nutrition. Metabolism 25:1287 (1976).

62 CHOCHRANE, W.: Idiophatic infantile hypoglycemia and leucine sensivity. Metabolism 9:386 (1961).

63 JOHNSON, P.; HERRNIG, B. and FIELD, J.B.: Effects of l-leucine and its metabolites on glucose uptake by rat diaphragm. Metabolism 10:415 (1961).

64 CASTER, W.O. and BLEECKER, S.: Hyperglycemic effect of amino compounds structurally related to caproate in rats. J.Nutr. 105:308 (1975).

65 WALSER, M.: The use of alpha keto analogues of essential aminoacids in Total Parenteral Nutrition. Editor: J.E.FISHER, LITTLE, BROWN and Co., Boston (1976).

66 SAPIR, D.G. and WALSER, M.: Nitrogen sparing induced early in starvation by infusion of branched-chain ketoacids. Metabolism: 26:301 (1977).

67 CLOSE, J.H.: The use of aminoacid precursors in nitrogen accumulating deseases. N.Engl.J.Med. 290:663 (1974).

68 WALSER, M.; COULTER, A.W.; DIGHE, S.et al.: The effect of ketoanalogues of aminoacids in severe chronic uremia. J.Clin.Invest. 52:678 (1973).

69 BOWDEN, J.A.; BRESTEL, E.A.; COPE, W.T.; MC ARTHUR, C.L.; WESTFOLL, D.N. and FRIED, M.: Ketoisocaproic acid inhibition by pyruvate and -Ketoglutarate oxidative decarboxylation in rat liver slices. Biochem. Med. 4:69 (1970).

70 DREYFUS, P.M. and PRENSKY, R.C.: Further Observations on biochemical Lesion in Maple Symp. Urine Disease Nature 214:276 (1967).

71 LINK, M.: Doktorarbeit, Univ. Würzburg (1980).

72 SCHLENK, G.: Doktorarbeit, Univ. Würzburg (1980).

73 GLÖCKNER, R.: Doktorarbeit, Univ. Würzburg (1980).

74 O'KEEFE, S.J.D.; SENDER, P.M. and JAMES, W.P.T.; "Catabolic" loss of body nitrogen in response to surgery. Lancet 2:1035, (1974).

75 BISTRIAN, B.R.; BLACKBURN, G.K.; HALLOWELL, E. and HEDDLE, R.: Protein states of general surgical patients. J.Am.Med.Ass. 230:858 (1974).

76 MEIKLE, A.W. and KLAIN, J.C.: Effect of fasting and fasting refeeding on conversion of leucine into CO_2 and lipids in rats. Am.J. Physiol. 223:1376 (1972).

77 ICHIHARA, A.; NODA, C. and OGAWA, K.: Control of leucine metabolism with special reference to branched-chain aminoacid transaminase isozymes. Advanc.Enyzme Regulat. 11:155 (1973).

78 COHEN, J.J. and WITTMANN, E.: Renal utilisation and axcretion of α-ketoglutarate in dog: effect of alkalosis. Am.J.Pysiol. 205:7559 (1973).

79 PASHLEY,D.H. and COHEN, J.J.: Substrate interconversion in dog kidney cortex slices: regulation by ECF-pH. Am.J.Pysiol. 225:1519 (1973).

80 ANGIELSKI, S. and LUKOWICZ, J.: The role of the kidney in the removal of ketone bodies under different acid-base status of the rat. Am.J.Clin.Nutr. 31:1635 (1978).

81 MIMURA, R.; YAMADA, C. and SWENSEID, M.E.: Influence of dietary protein levels and hydrocortisone administration on the branched-chain aminoacid transaminase activities in rat tissues. J.Nutr. 95:493 (1968).

82 LYSIAK, W.; MUZALEWSKA, A. and ANGIELSKI, S.: Branched-chained amino-transferase in brain tissue. Acta Biochim.Polon. 17:121 (1970).

83 FAJANS, S.S.; KNOPF, R.F.; FLOYD,jr.C.; POWER, L. and Conn, J.W.: The experimental induction in man of sensitivity to leucine hypoglycemia. J.Clin.Invest. 42:216 (1963).

84 LYSIAK, W.; STEPINSKI, J. and ANGIELSKI, S.: Inhibition of α-oxoglutarate and pyruvate oxidation by α-oxoderivates of leucine and valine in rat tissues. Acta Biochim.Polon. 17:131 (1970).

85 ANGIELSKI, S. and LYSIAK, W.: Inhibition of pyruvate and oxoglutarate oxidation by branched-chain amino-aciduria. Proceedings of the second congress of the international association for the scientific study of mental deficiency, Warsawa, Poland, 187 (1970).

86 BARRIT, G.J.; ZANDER, G.L. and UTTER, M.F.: The regulation of pyruvate carboxylase activity in glucogengenic tissues. In: Gluconeogenesis: Its regulation in mammalian species (R.W.Hanson and M.A. Mehlmann, eds.), John Wiley and sons, New York, London, Sidney, Toronto p.3, (1976).

87 NEWSHOLME, E.A. and START, C.: Regulation in metabolism. John Wiley and sons, New York, London, Sidney, Toronto, p.305 (1973).

88 STUMPF, B.; KRAUS, H. and KASTEN, R.: The influence of branched-chain amino acids and their ketoderivates on renal gluconeogenesis. In: Renal metabolism in relation to renal function. Hans Huber Publishers, Bern, Stuttgart, Wien, p.51 (1976).

89 SKETSCHER, R.D.; FERN, E.B. and JAMES, W.P.T.: The adaptation in muscle oxidation of leucine to dietary protein and energy intake. Br.J.Nutr. 31:333 (1974).

90 MC FARLANE, I.G. and VAN HOLT, G.: Metabolism of leucine in protein-calorie-deficient rats. Biochem. J. 111:565 (1969).

91 REEDS, P.J.: The catabolism of valine in the malnourished rat. Studies in vivo and in vitro with different labelled forms of valine. Br.J.Nutr. 31:259 (1974).

92 FULKS, R.M.; LI, J.B. and GOLDBERG, A.L.: Effects of insulin glucose and aminoacids on protein turnover in rat diaphragm. J.Biol.Chem. 250:290 (1975).

93 MILLER, L.L.: The role of the liver and non hepatic tissues in the regulation of free amino acidslevels in blood. In: Amino acids pools (J.T.Holden, ed.) Elsevier Publishing Co., Amsterdam p.708 (1962).

94 DAWSON, A.G.; HIRD, J.R. and MORTON, D.J.: Oxidation of leucine by rat liver and kidney. Arch. Biochem.Biophys. 122:426 (1967).

95 GOODMAN, H.M.: Stimulatory action of insulin on leucine uptake and metabolism in adiopose tissue. Am.J.Physiol.206:7595 (1974).

96 LEE, K.L. and KENNEDY, F.T.: Regulation of tyrosine α-ketoglutarate transaminase in rat liver. Regulation by l-leucine in cultured hepatoma cells. J.Biol.Chem. 246:7595 (1971).

97 RANNELS, E.D.; HJALMARSON, A.C. and MORGAN, H.E.: Effects of noncarbohydrate substrates on protein synthesis in muscle. Am.J. Physiol. 226:528 (1974).

98 CHAWLA, R.K. and RUDMAH, D.: Utilization of α-Keto and α-Hydroxy analogues of valine by the growing rat. J.Clin.Invest. 54:271 (1974).

99 BUSE, M.G.; BIGGERS; J.F.; DRIER, C. and BUSE, J.F.: The effect of epinephrine, glucagon and the nutritional status on the oxidation of branched-chain amino acids and pyruvate by isolated hearts and diaphragms of the rat. J.Biol.Chem. 248:697 (1973).

100 GREENBERG, F.; REAVEN, G.: The effect of l-Leucine on hepatic glucose formation. Pediatrics 37:974 (1966).

101 HEDRICK, J.L. and FISCHER, E.H.: On the role of pyridoxal 5-phosphate in phosphorylase. I. Absence of classical vitamin B_6-dependent enzymatic activities in muscle glycogen phosphorylase. Biochemistry 4:1337 (1965).

102 MONTGOMERY, R.: Determination of Glycogen. Arch. Biochem. Biophys. 67:378 (1957).

L E B E N S L A U F

18.05.1952	Geburt als Sohn von Franz Ludwig Kittel, Lehrer und Maria Kittel, geb. Mannel in Schweinfurt
1958 - 1962	Besuch der Volksschule in Schweinfurt
1962 - 1971	Besuch des Celtisgymnasiums Schweinfurt mit Abitur am 26.06.1971
01.10.1971	Beginn des Studiums der Chemie (Diplom) an der Universität Würzburg
22.02.1975	Vordiplom in Chemie mit "gut" bestanden
01.04.1975	Beendigung des Chemiestudiums und Wechsel zu Humanmedizin
15.10.1979 - 15.09.1980	Praktisches Jahr an der Universitäts-Nervenklinik Würzburg und Städt. Krankenhaus Schweinfurt (Chir. und Inn.)
06.06.1980	Heirat mit Elke Schretzmann, Lehrerin, in Schweinfurt
07.10.1980 und 24.10.1980	Den Dritten Teil des Staatsexamens in Medizin bestanden.

Würzburg, den 12. November 1980

Rainer Kittel